

TRANSFER-RNA (GUANIN - 7) METHYL-
TRANSFERASE AUS ESCHERICHIA COLI

von

Holger Elten

aus

Hessisch - Oldendorf

1977
1

1977 № 305



Digitized by the Internet Archive
in 2026

TRANSFER-RNA (GUANIN - 7) METHYL- TRANSFERASE AUS ESCHERICHIA COLI

Den Naturwissenschaftlichen Fachbereichen
der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg

zur

Erlangung des Doktorgrades

vorgelegt

von

Holger Elten

aus

Hessisch - Oldendorf



Als Dissertation genehmigt von den Naturwissenschaftlichen
Fachbereichen der Universität Erlangen-Nürnberg

Tag der mündlichen Prüfung: 20. 7. 1977

Vorsitzender der Promotionskommission:	Professor Dr. E. Schweizer
Erstberichterstatte:	Professor Dr. H. Kersten
Zweitberichterstatte:	Professor Dr. C.G. Arnold

Die vorliegende Arbeit wurde bei Frau Prof. Dr. H. Kersten

- Arbeitsgruppe Biochemie -
Fachbereich Chemie/Biologie

an der Universität Erlangen-Nürnberg durchgeführt

Meinen Eltern und meiner Frau gewidmet

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	1
2.	Material und Methoden	6
2.1.	Chemikalien und Geräte	6
2.2.	Präparation von Substraten für Methyltransferasen	8
2.2.1.	Untermethylierte Gesamt t-RNA aus E. coli	8
2.2.2.	Initiator t-RNA ($t\text{-RNA}_f^{\text{Met}}$) aus B. subtilis	8
2.2.3.	Charakterisierung der Substrate	8
	- Methylierung der t-RNAs	9
	- Aminoacylierung der t-RNAs	9
	- Elektrophoretische Reinheit der Substrate	11
	- UV-Absorptionsspektren und Gehaltsbestimmung	12
2.3.	Gewinnung von Proteinfractionen mit Methyltransferase Aktivität	13
2.4.	Gelchromatographie an Sephadex G 25	16
2.5.	Affinitätschromatographie	16
2.5.1.	Koppelung von t-RNA (E. coli MRE 600) an CNBr aktivierte Sepharose 4 B	16
2.5.2.	Trennung von Proteinfraction B an t-RNA-Sepharose	17
2.6.	t-RNA Methyltransferase Test	17
	- Test mit untermethylierter Gesamt t-RNA	17
	- Messung der Methyltransferase Aktivität mit spezifischer t-RNA	18
2.7.	Basen- und Nucleotidanalyse	19
2.8.	Proteinbestimmung	19
2.9.	Polyacrylamid Gelelektrophorese	20
2.10.	Molekulargewichtsbestimmung durch Diffusionschromatographie an Sephadex G 200	21

3.	Ergebnisse	23
3.1.	Anreicherungsversuche von t-RNA Methyltransferasen durch Affinitätschromatographie an t-RNA Sepharose 4 B	23
3.2.	Versuche zur Anreicherung einer t-RNA (Uracil-5) Methyltransferase	28
3.3.	Anreicherung einer t-RNA (Guanin-7) Methyltransferase	33
3.3.1.	Stabilisierung und Lagerung von Proteinen mit Methyltransferase Aktivität	36
3.3.2.	Untersuchung der durch Affinitätschromatographie gewonnenen Proteinfractionen	38
	- Methylierung von E. coli t-RNA und Analyse der methylierten Basen	38
	- Abbau der $^{14}\text{CH}_3$ -methylierten Substrate aus E. coli und B. subt. zu Nucleotiden	41
	- Messung der Methyltransferase Aktivität mit spezifischer t-RNA	47
	- RPC-5 Auftrennung von in vitro methylierter t-RNA aus E. coli K 12 mit gereinigtem Enzym	50
3.4.	Charakterisierung des angereicherten Enzyms	52
3.4.1.	Elektrophoretische Eigenschaften	52
3.4.2.	Molekulargewichtsbestimmung durch Diffusionschromatographie an Sephadex G 200	54
3.4.3.	Bestimmung des pH Optimums	54
3.4.4.	Bestimmung der optimalen Mg^{++} Konzentration	59
3.4.5.	Bestimmung der Michaelis Konstanten	61
4.	Diskussion	64
5.	Zusammenfassung	72
6.	Literaturverzeichnis	73
7.	Anhang	77

Abkürzungen

A ₂₅₄	Absorption bei 254 nm
ATP	Adenosintriphsphat
BD-Cellulose	benzoylierte Diäthylaminoäthylcellulose
EDTA	Äthylendiamintetraessigsäure
HEPES	2-4-(2-Hydroxyäthyl) piperazinyl-(1)- äthan-sulfonsäure
OD ₂₆₀	1 OD ₂₆₀ ist diejenige Substanzmenge, die gelöst in 1 ml, bei 260 nm und d = 1 cm die Extinktion 1 ergibt
PAA	Polyacrylamid
POPOP	1,4-bis-2-(4-Methyl-5-phenyloxazolyl)-benzol
PPO	2,5-Diphenyloxazol
RPC	<u>R</u> eversed- <u>P</u> hase- <u>C</u> hromatographie
SAM	S-Adenosyl-Methionin
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	N'N'N'N' Tetramethyl-äthylendiamin
TMMG	Triäthanolamin / Magnesium
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
t-RNA ^{CH₃-}	untermethylierte Gesamt t-RNA
t-RNA ^{Met_f}	Methionin spezifische t-RNA (formylierbar)
t-RNA ^{Phe}	Phenylalanin spezifische t-RNA

1. Einleitung

In allen Zellen kommen mehrere Arten von Ribonucleinsäuren vor, die entsprechend ihrer Funktion wie folgt eingeteilt werden.

Die messenger Ribonucleinsäure (m-RNA) überträgt die in den Strukturgenen der DNA enthaltene Information auf die Proteine.

Die ribosomalen Ribonucleinsäuren (r-RNA) sind Bestandteile der Ribosomen an denen die Proteinbiosynthese abläuft.

Die transfer Ribonucleinsäuren (t-RNA) werden jeweils mit einer spezifischen Aminosäure beladen; sie enthalten ein Anticodon und ermöglichen am Ribosom die Translation der m-RNA in spezifische Proteine.

Spezifische t-RNAs haben außerdem regulatorische Funktionen. Littauer et al. 1973 (29) Die t-RNAs machen ca. 20% der gesamten RNA in der Zelle aus, die Angaben über die Anzahl spezifischer t-RNAs schwanken zwischen 40 - 60 verschiedenen Molekülen. Das Molekulargewicht von t-RNA beträgt etwa 25 000 - 30 000 Dalton, das entspricht einer Anzahl von 75 - 85 Nucleotiden.

Im Verlauf der Biosynthese von Ribonucleinsäuren werden zunächst größere Transcriptionseinheiten gebildet, die dann in einem Vorgang, der als Reifung bezeichnet wird, auf die endgültige Größe "zurechtgeschnitten" werden. Dabei werden nicht nur endständige Oligonucleotide abgespalten, sondern auch Modifikationen ins Molekül eingeführt. Beide Vorgänge werden von spezifischen Enzymen verrichtet.

In fast allen RNAs sind bisher modifizierte Nucleoside gefunden worden. Sowohl Basen- als auch Ribosereste (2') können modifiziert sein. In r-RNA und t-RNA bestehen die Modifikationen zu einem großen Teil, in m-RNA ausschließlich aus Methylierungen.

Am besten untersucht sind die Modifikationen der m-RNA. Es gibt Hinweise dafür, daß die Methylierung von m-RNA ihre Translation ermöglicht, Both et al. 1975 (14). Über Modifikationen der r-RNA ist bekannt, daß sie in einigen Bereichen gehäuft, als "cluster", vorkommen. In der kleinsten r-RNA die in der Ultrazentrifuge bei 5 S sedimentiert wurden bisher keine Modifikationen gefunden.

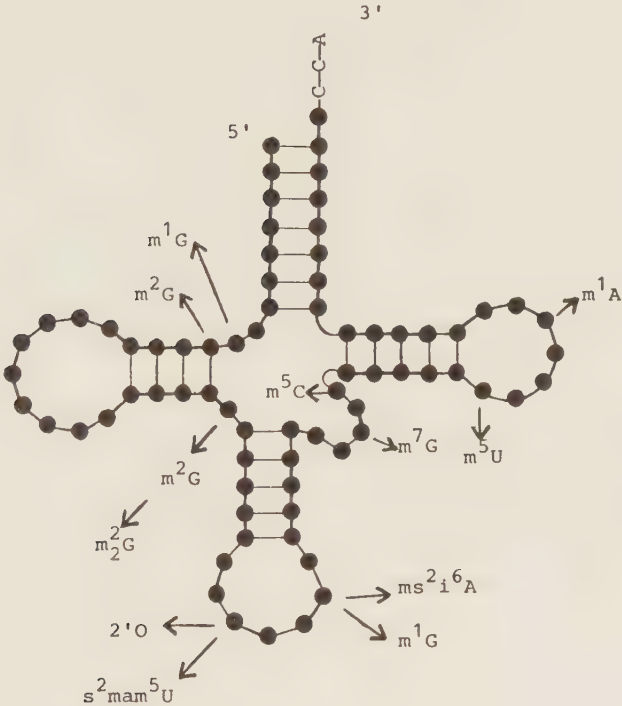
In der t-RNA finden sich Methylierungen vorzugsweise an bestimmten Positionen der t-RNA Moleküle (siehe Abb. 1). In den t-RNAs der Bakterien kommen am häufigsten zwei methylierte Basen vor; 5-Methyl-Uracil und 7-Methyl-Guanin. Während zumindest bei *E. coli* in allen bisher sequenzierten t-RNAs 5-Methyl-Uracil (m^5U) gefunden wurde, kommt 7-Methyl-Guanin (m^7G) nur in einigen t-RNA Species vor.

Über die Funktion der Methylgruppen ist noch wenig bekannt. Von dem in allen t-RNAs vorkommenden Ribothymidin (m^5U) in Schleife 4 in der Sequenz G T Ψ C wird vermutet, daß es für die Bindung der t-RNA an Ribosomen notwendig ist. In der 5 S r-RNA wurde eine komplementäre Sequenz zu G T Ψ C gefunden, Richter et al. 1973 (43).

Erstmals wurde 1962 über Enzyme berichtet, die Methylgruppen von Methionin über S-Adenosyl-Methionin auf t-RNAs übertragen, Fleissner et al. 1962 (17), Kerr et al. 1972 (23). Vor kurzem wurde gezeigt, daß in *B. subtilis* eine t-RNA (Uracil-5) Methyltransferase vorkommt, die als Cosubstrat ein Derivat der Tetrahydrofolsäure verwendet, Kersten et al. 1975 (25), Delk et al. 1976 (15)

Verschiedene Arbeitsgruppen haben sich seit der Entdeckung dieser Enzyme mit dem Problem der Anreicherung und Isolierung befasst. Aus den verschiedensten biolog.

Abb. 1 Methylierungen die in bisher sequenzierten t-RNAs gefunden worden sind



Die verwendeten Abkürzungen bedeuten:

m^1G	1-Methyl-Guanin	m^1A	1-Methyl-Adenin
m^2G	2-Methyl-Guanin	$2'O$	2'-O-Methyl-Ribose
m_2^2G	2-Dimethyl-Guanin	s^2mam^5U	2-Thio-5-Methylamino-methyl-Uracil
m^7G	7-Methyl-Guanin	ms^2i^6A	2-Methylthio-N ⁶ -isopentenyl-Adenin
m^5U	5-Methyl-Uracil		
m^5C	5-Methyl-Cytosin		

Systemen sind Enzymextrakte dargestellt und Methyltransferasen angereichert worden (Zusammenfassende Literatur Kerr et al. 1972 (23) und Nau 1976 (36)). Mit den klassischen chromatographischen Verfahren konnten bisher allerdings keine reinen t-RNA Methyltransferasen gewonnen werden. Die Schwierigkeit beim Nachweis und der Aufarbeitung spezifischer Methyltransferasen liegt darin, daß homologe spezifische untermodifizierte t-RNAs als Substrate fehlen und t-RNA Methyltransferasen sehr instabil sind.

Als Substrate für einige t-RNA Methyltransferasen können t-RNAs aus heterologen Organismen dienen. Zur Messung der Gesamt-Methyltransferasen wurde bisher in den meisten Fällen eine t-RNA aus *E. coli* K 12-58-161 $F^- Met^- rel^-$ verwendet, in der sich bei Methionin-Mangel untermethylierte t-RNA anhäuft.

Erstmals wurde ein nahezu reines Protein durch eine kombinierte Anwendung von Ionenaustausch- und Affinitätschromatographie gewonnen. Es handelte sich um eine t-RNA (Uracil 2-Thio-5-Methylaminomethyl) Methyltransferase, Taya et al. 1973 (48).

Die Affinitätschromatographie wurde zuerst für die Isolierung von Aminoacyl-t-RNA-Synthetasen eingesetzt, Remy et al. 1972 (41). Dazu wurde Sepharose als Matrix eingesetzt, an die t-RNA kovalent gekoppelt war. Seither haben verschiedene Autoren Anreicherungen von Aminoacyl-t-RNA-Synthetasen als auch von t-RNA Methyltransferasen beschrieben. Taya et al. 1973 (48), Hayashi et al. 1973 (19), Befort et al. 1974 (11), Wierzbicka et al. 1975 (50), Jakubowski et al. 1975 (21).

Im Arbeitskreis Kersten in der die vorliegende Arbeit angefertigt wurde, wurde von H.J. Aschhoff zur Anreicherung von t-RNA Methyltransferasen aus *E. coli* die Affinitätschromatographie benutzt mit Sepharose als Matrix, an die Gesamt t-RNA gekoppelt wurde. Im Jahr

1974, zu Beginn dieser Arbeit waren aus *E. coli* Extrakten t-RNA (Guanin) Methyltransferasen angereichert, Aschhoff 1974 (7).

In der vorliegenden Arbeit sollten Guanin spezifische t-RNA Methyltransferasen aus *E. coli* weiter gereinigt und charakterisiert werden.

In dieser Arbeit wurde eine t-RNA (Guanin-7) Methyltransferase aus *E. coli* MRE 600 durch Verbesserung der Affinitätschromatographie über 1000 fach angereichert. Das Enzym katalysiert ausschließlich die Bildung von 7-Methyl-Guanin in untermethylierter t-RNA aus *E. coli* K 12. Das angereicherte Enzym überträgt die Methylgruppe von S-Adenosyl-Methionin auf die Initiator t-RNA aus *B. subtilis* W 23, wobei 0,8 Mol Methylgruppen pro Mol t-RNA gebildet werden. Diese spezifische t-RNA wurde im Laufe des Jahres 1975 im Arbeitskreis Kersten isoliert. Sie unterscheidet sich von der entsprechenden *E. coli* t-RNA_f^{Met} dadurch, daß neben nur geringfügigen Unterschieden in der Sequenz zwei methylierte Nucleoside fehlen (⁷mG und C_m), Yamada et al. 1975 (52). Es wird vermutet, daß das Enzym spezifisch eine Position im Extrarm der t-RNA_f^{Met} erkennt (Position 47 vom 5' Ende her gezählt) und die Methylgruppe dort einführt.

2. Material und Methoden

2.1. Chemikalien und Geräte

Die verwendeten Chemikalien wurden von folgenden Firmen bezogen:

Behringwerke Marburg	Rinderserumalbumin, Transferrin
Boehringer Mannheim	Transfer-RNA E. coli MRE 600, S-Adenosyl-Methionin
Calbiochem San Diego	Ribonuclease T ₂
Pharmacia Frankfurt	Sephadex G 25 und G 200, Sepharose 4B CNBr aktiviert
Radiochemical Centre Amersham	¹⁴ C-Aminosäuren und ¹⁴ C-S-Adenosyl- Methionin wurden in folgenden spezifischen Aktivitäten geliefert: Met 56 mCi/mMol Phe 522 " SAM 55 "

Die jeweils verwendete spez. Radioaktivität die durch Verdünnung hergestellt wurde wird bei den Versuchen angegeben.

Serva Heidelberg	Acrylamid, Bisacrylamid, Protaminsulfat, Coomassie Brilliant Blue
------------------	---

Alle anderen Chemikalien waren Produkte der Fa. Merck Darmstadt mit dem Reinheitsgrad "pro analysi". Dünnschicht Chromatographien wurden auf Cellulose Platten der gleichen Firma ohne Fluoreszenz Indikator durchgeführt.

Autoradiographien der Platten wurden mit Röntgenfilmen der Fa. Agfa (Osray T₄ 24 x 30 cm) erhalten.

Säulenchromatographien wurden in Glassäulen der Fa. Laborcenter Erlangen durchgeführt.

Die UV-Absorption des Eluates der Säulenchromatographien, die automatische Registrierung und Fraktionierung wurde mit Geräten der Fa. LKB Producter AB Bromma Schweden

gemessen, bzw. durchgeführt (Uvicord I und II, Zwei- und Sechskanal Schreiber, Fraktionssammler Ultrorac). Konstanter Säulendurchfluß wurde mit Perpex Pumpen erreicht, Gradienten mit einem Gradientenmischer Typ Ultrograd hergestellt; alles LKB Geräte.

Wenn nicht anders angegeben wurden Säulenchromatographien bei 0°C und sowohl Registrierung als auch Fraktionierung in einer Kühltruhe der Fa. Colora Lorch durchgeführt.

Die optische Dichte von Protein- oder Nucleinsäurefraktionen wurde in Zeiss Photometern Typ PMQ II und III bestimmt. Kontinuierliche Spektren wurden mit einem Beckman Gerät, Modell 25 aufgenommen.

Die Radioaktivität wurde in Flüssigkeits-Szintillationszählern der Fa. Packard (Modell 3320 und 3385) bestimmt. Für die Zählung verwendete Szintillatoren wurden von Fa. Zinsser Frankfurt geliefert. Die Szintillatorlösungen hatten folgende Zusammensetzung:

1. Toluolszintillator: 2,5 Diphenyloxazol (PPO) 5,0 gr.
 1,4 bis-2-(4-methyl-5-phenyl-oxazolyl) Benzol
 (POPOP) 0,3 gr.
 Toluol ad 1000 ml
2. Dioxanszintillator: Naphtalin 60,0 gr
 Äthylenglykol 20 ml
 Methanol 100 ml
 PPO 4,0 gr.
 POPOP 0,2 gr.
 Dioxan ad 1000 ml

Polyacrylamid Gelelektrophoresen von t-RNAs und Proteinen wurden in einer Apparatur nach Shandon durchgeführt. Für die Auftrennung von Proteinen bei 0°C wurde eine Eigenkonstruktion verwendet (siehe Anhang).

2.2. Präparation von Substraten für Methyltransferasen

2.2.1. Untermethylierte Gesamt t-RNA aus *E. coli*

Escherichia coli K 12-58-161 F^- Met $^-$ rel $^-$ wurde in einem 20 Liter Fermenter (Eschweiler Kiel) in Minimalmedium mit 3 mg Methionin/Liter gezüchtet. Die t-RNA wurde nach der Vorschrift von Mittbach 1973 (34) präpariert.

Dabei werden die Bakterien zunächst phenolisiert und aus dem Extrakt die Nucleinsäuren mit Äthanol ausgefällt. Die Gewinnung reiner t-RNA wird durch Chromatographie an DEAE Cellulose erreicht. Danach wird erneut mit Äthanol gefällt und die t-RNA dann in kleinem Volumen Wasser gelöst.

Für Testzwecke wurde ein geringer Teil t-RNA auf eine Konzentration von 0,2 - 2 OD₂₆₀ pro 50 μ l Wasser verdünnt. Die jeweils verwendete Konzentration ist an entsprechender Stelle angegeben.

2.2.2. Initiator t-RNA (t-RNA_f^{Met}) aus *B. subtilis*

Die Initiator t-RNA aus *B. subtilis* W 23 wurde nach einem im Arbeitskreis Kersten erarbeiteten Verfahren isoliert, Raettig et al. 1976 (40).

Dabei wird zunächst die Gesamt t-RNA präpariert und anschließend in drei verschiedenen Chromatographie-Schritten (BD Cellulose, RPC 5 System, BD Cellulose) die formylierbare t-RNA angereichert (t-RNA_f^{Met}).

2.2.3. Charakterisierung der Substrate

Die gewonnenen Substrate wurden zunächst auf ihre biologische Aktivität und Reinheit untersucht.

Methylierung der t-RNA

Die Methylierbarkeit einer t-RNA Charge wurde im in vitro Testansatz geprüft. Die Durchführung dieses Testes ist unter 2.6. beschrieben. E. coli t-RNAs enthalten durchschnittlich 2,3 Methylgruppen pro t-RNA Molekül. Aus E. coli wurde t-RNA gewonnen, die bis zu 50 % untermethyliert war, in die also bei der Methylierung 1,15 Mol Methylgruppen pro Mol t-RNA eingeführt werden konnte. Eine t-RNA Charge wurde für weitere Versuche nur verwendet, wenn die Aufnahme an Methylgruppen bei mindestens 0,6 (Mol/Mol) lag.

Für die Initiator t-RNA gilt analoges, die optimale Methylierbarkeit mit gereinigtem Enzym sollte hier bei 1 Mol/Mol liegen. Experimentell ermittelten wir einen Wert von 0,85 Methylgruppen pro Mol t-RNA. Diese t-RNA ist noch geringfügig mit anderen t-RNA Species verunreinigt (t-RNA^{Glu}, t-RNA^{Gly}). Aus dem gleichen Grunde wurde bei der Aminoacylierung auch nie der optimale Wert erreicht. Raettig et al.1976 (40)

Aminoacylierung der t-RNAs

Die Bestimmung der biologischen Aktivität wurde routinemäßig mit durchgeführt. Für t-RNA aus E. coli ist eine Acylierbarkeit von 50 - 60 pMol/OD₂₆₀ bezogen auf Phenylalanin optimal. Eine Charge untermethylierter t-RNA aus E. coli wurde für weitere Versuche nur verwendet, wenn die Acylierbarkeit bezogen auf Phenylalanin mindestens bei 40 pMol/OD₂₆₀ lag.

Für das spezifische Substrat (t-RNA_f^{Met}) gilt, daß die Endbeladung mit Methionin ein direktes Maß für das Vorliegen reiner und intakter t-RNA ist. In der folgenden Tabelle sind die Daten der t-RNAs zusammengefasst, die in dieser Arbeit verwendet wurden.

		Methylierung	Acylierung	
			Phe	Met
E. coli t-RNA ^{CH₃}	1)	1087	39,4	-
	2)	1469	45	-
B. subtilis t-RNA ^{Met} _f	3)	900	-	1049
	4)	1076	-	1179

Tab. 1

Biologische Aktivität der verwendeten Substrate (Methylierbarkeit und Acylierbarkeit). Angaben in pMol/OD₂₆₀

Der Testansatz für die Aminoacylierung enthielt:
(Raettig Diss. 1976)

	Ansatz für Met	Ansatz für Phe
Hepes ¹ /NaOH Puffer pH 7,8	100 mM	-
Glycin/NaOH Puffer pH 8,4	-	100 mM
Magnesiumacetat	10 mM	20 mM
Kaliumchlorid	10 mM	20 mM
ATP	4 mM	1 mM
¹⁴ C-Aminosäure	70 uM	22 mM
Rohextrakt (S-100) ²	100 ug	20 ug
t-RNA	1 OD ₂₆₀	1 OD ₂₆₀

Das Gesamt volumen des Ansatzes betrug 250 ul

¹Hepes = 2-4-(2-Hydroxyäthyl) piperazinyl-(1)-äthansulfonsäure

²S-100 = Überstand einer 100 000 x g Zentrifugation eines Rohextraktes (ug = Protein im Rohextrakt).

Elektrophoretische Reinheit der Substrate

Diese Untersuchung wurde in vertikalen Stäbchengelen nach Richards et al. 1965 (42) durchgeführt. Um eine gleichmäßige Polymerisation zu erhalten wurden die Gele abweichend von der Vorschrift bereitet. Das Trenngel wurde mit 0,14 % Ammonium peroxydisulfat und 0,23 % TEMED¹ anstelle von Riboflavin chemopolymerisiert. Die Gele bestanden aus:

7 cm Trenngel	10 % Polyacrylamid
	Puffersystem: Tris/HCl pH 8,9
4 cm Sammelgel	2,5 % Polyacrylamid
	Puffersystem: Tris/HCl pH 7,8

Pro Gelstäbchen ($\varnothing = 5 \text{ mm}$) werden ca. 1 OD₂₆₀ mit 30 % Saccharose und Bromphenolrot als Marker aufgetragen und die Elektrophorese bei einer max. Stromstärke von 1,5 mA/Gel durchgeführt. Nach dem Entfernen der Gele aus den Glasrohren mit einer stumpfen Kanüle mit Wasserspritze wird ca. 2 Stunden in 0,3 M Lanthanacetat Lösung fixiert und anschließend mit 0,2 % Methylenblau in 0,4 M Na-acetat Puffer pH 4,3 nach Peacock et al. 1967 (38) gefärbt. Die Entfärbung (Entfernung des überschüssigen Farbstoffes) wird in Wasser durchgeführt.

t-RNA Elektrophoresen von verschiedenen t-RNAs die in dieser Arbeit verwendet wurden sind in Abb. 2 gezeigt.

¹TEMED = N'N'N'N' Tetramethyl-äthylendiamin

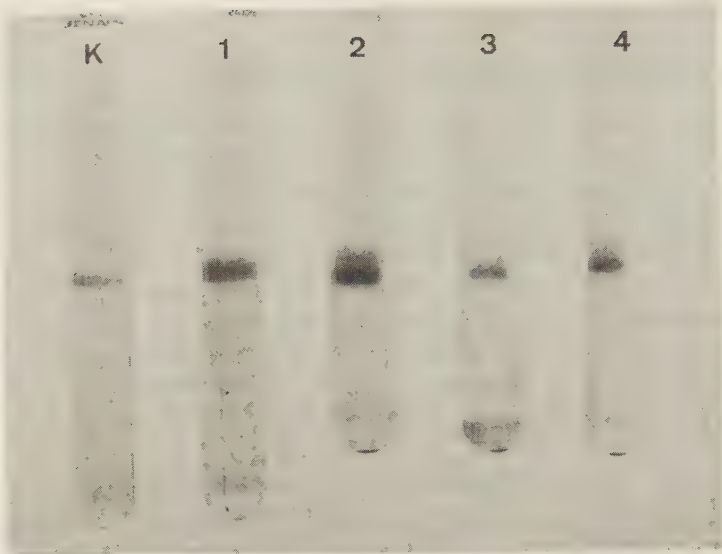


Abb. 2

Polyacrylamid Gelelektrophorese verschiedener t-RNAs
Analysenbedingungen siehe S. 11

K = Kontrolle (E. coli t-RNA von Boehringer)

1 = untermethylierte Gesamt t-RNA E. coli

2 = " " "

3 = t-RNA^{Met}_f B. subtilis

4 = " "

Bezeichnungen
siehe S. 10

UV Absorptionsspektren und Gehaltsbestimmung

Als weitere Reinheitsprüfung wurde das Absorptionsspektrum der jeweiligen t-RNA (200 - 300 nm) aufgenommen. Bei reinen Nucleinsäure Präparationen liegen die Quotienten:

$$\frac{A_{260}}{A_{235}} \quad \text{und} \quad \frac{A_{260}}{A_{280}} \quad \text{bei Werten um } 2,0$$

Zur Konzentrationsbestimmung wurde die Absorption bei 260 nm benutzt. Wir haben zugrunde gelegt:

$$1 \text{ OD}_{260} = 44 \text{ ug RNA}$$

gemessen in einer Quarzküvette von 1 cm Schichtdicke

2.3. Gewinnung von Proteinfractionen mit Methyltransferase Aktivität

E. coli MRE 600 wurde im 100 l Fermenter in Minimalmedium bis zum Ende der log. Wachstumsphase bei der Fa. Boehringer Tutzing gezüchtet. Nach der Ernte mittels Durchlaufzentrifuge wurden Chargen von 500 g. Bakterien Feuchtgewicht in 2500 ml 0,01 M Tris/HCl Puffer pH 7,5 0,01 M $MgCl_2$ aufgeschlämmt. Diese Suspension wurde durch Hochdruckdispersion bei 500 at aufgeschlossen. (Dispergator: Manton Gaulin Manuf. Co. Inc. Everett Mass. USA) Die Passagedauer durch die Maschine betrug 2 Min. Um einen optimalen Aufschluss zu erzielen, wird die Suspension ein zweites Mal durch die Maschine gegeben. Nach Zentrifugation über 90 Min. bei 13 000 x g (Sorvall RC - 2B) wurden im Überstand 4000 ml leicht opalescenter Rohextrakt erhalten, der einen Proteingehalt von 14 mg/ml hatte. Diesem Rohextrakt wurden 2700 ml wässrige 0,5 % Protaminsulfat Lösung zugesetzt um die Nucleinsäuren auszufällen. Unter diesen Bedingungen werden die meisten Proteine die mit Nucleinsäuren wechselwirken mitgefällt. Die anschließende Zentrifugation über 45 Min. bei 3000 x g (Beckmann Mistral 6L) ergibt einen klaren, gelblich gefärbten Überstand, der mit Ammonium sulfat gesättigt wurde. Dabei werden die Proteine ausgefällt. (Proteinfraction A)

Der verbliebene Niederschlag wurde mit 2300 ml 0,3 M K-succinat Puffer pH 6,0 extrahiert und dann über 45 Min. bei 3000 x g zentrifugiert. Der klare farblose Überstand (2300 ml, Proteingehalt 3,45 mg/ml) wurde mit Ammonium sulfat gesättigt und bei 0°C aufbewahrt. Die ausgefallenen Proteine (Proteinfraction B) wurden für diese Arbeit verwendet.

Die Proteinfraction B wurde mir für meine Versuche von Herrn Dr. Aschhoff zur Verfügung gestellt.

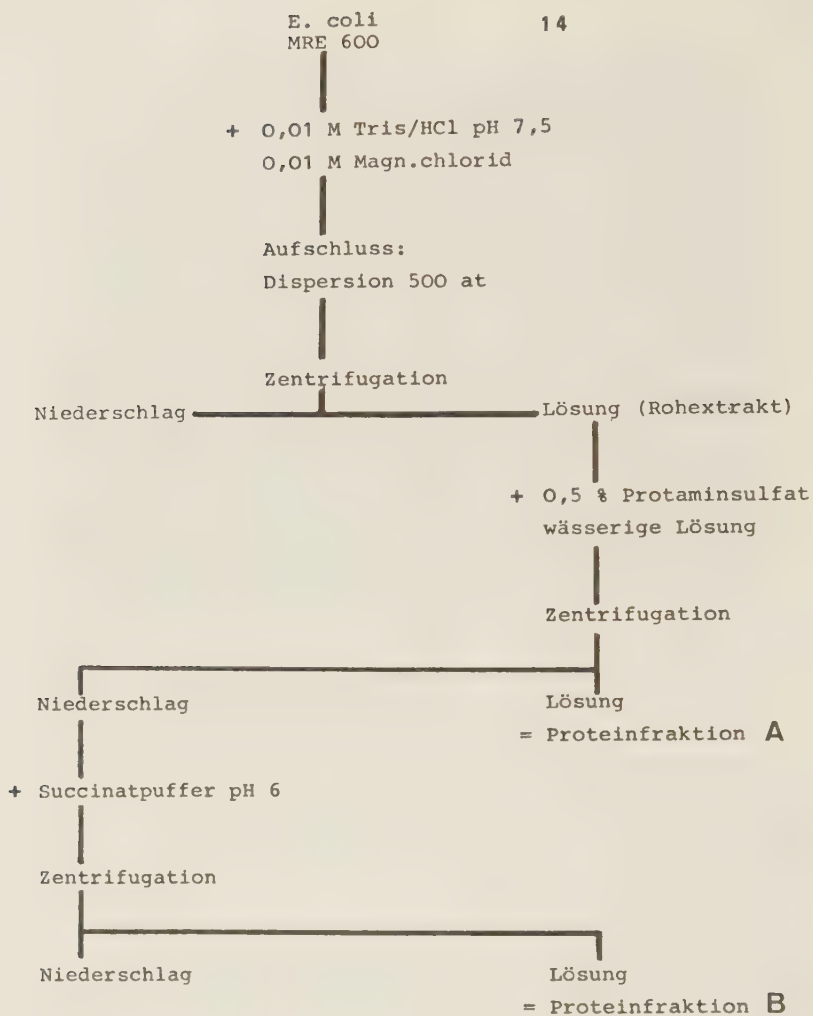


Abb. 3

Schematische Darstellung der Präparation von Proteinfraktion B aus *Escherichia coli* MRE 600.



Abb. 4

Gelchromatographie von Proteinfraction B an Sephadex G 25; weitere Erläuterungen im Text (2.4.).

2.4. Gelchromatographie an Sephadex G 25

Zur weiteren Verwendung der Proteinfraktion B muß diese zunächst entsalzt und umgepuffert werden und zwar in Portionen, die für die weitere Aufarbeitung benötigt werden.

Dazu wurden jeweils 200 ml der mit Ammonium sulfat gesättigten Suspension über 30 Min. bei 18 000 x g sedimentiert (MSE 18). Das Sediment wurde in eiskaltem 0,05 M Tris/HCl Puffer pH 8,0 gelöst; dabei wurde nur soviel Puffer verwendet, daß sich gerade eben eine klare Lösung ergab.

Diese Lösung wurde bei 0 - 1°C auf eine Sephadex G 25 Säule aufgetragen (l=40, Ø=3 cm, Durchfluß 40 ml/h), die mit dem oben beschriebenen Puffer äquilibriert war. In den Fraktionen des ersten Gipfels wurde der Proteingehalt über eine Flankenmessung im UV bei 215,5 und 225 nm (2.8.) bestimmt. Diese Fraktionen enthalten Proteine die im Ausschluß gelaufen sind mit einem Molekulargewicht > 8000. Mit diesem Verfahren werden nicht nur Salze sondern auch niedermolekulare Bestandteile abgetrennt. Die Fraktionen des ersten Gipfels (Fr. 9 - 16 siehe Abb. 3) wurden für die Anreicherung von t-RNA Methyltransferasen verwendet.

2.5. Affinitätschromatographie

2.5.1. Koppelung von t-RNA (E.coli MRE 600) an CNBr aktivierte Sepharose 4 B

Die t-RNA Sepharose für die Affinitätschromatographie wurde nach der Methode von Remy et al. 1972 (41) präpariert. Dabei wird zunächst CNBr aktivierte Sepharose 4 B mit Hydrazin umgesetzt. Parallel dazu wird t-RNA mit NaJO₄ oxydiert und an die Hydrazin-Sepharose gekoppelt. Die entstehenden Doppelbindungen werden schließlich mit NaBH₄ hydriert. Es resultiert eine

Sepharose, an die t-RNA kovalent über das 3' Ende gebunden ist.

Der t-RNA Gehalt, der für die Affinitätschromatographie jeweils verwendeten t-RNA Sepharose wird im Ergebnisteil bei den Versuchen angegeben.

2.5.2. Trennung von Proteinfraction B an t-RNA Sepharose

Die t-RNA Matrix (2.5.1.) wurde in einer Säule mit der vorbereiteten Proteinfraction B (siehe 2.4.) beladen. Die jeweils aufgetragenen Mengen und weitere Einzelheiten sind im Ergebnisteil bei den Versuchen angegeben.

2.6. t-RNA Methyltransferase Test

Test mit untermethylierter Gesamt t-RNA

Die enzymatische Übertragung von Methylgruppen wurde nach der Methode von Hurwitz et al. 1964 (20) durchgeführt. Als Substrat diente die untermethylierte Gesamt t-RNA aus E. coli K 12 (siehe 2.2.1.), als Cosubstrat wurde ^{14}C -S-Adenosyl-Methionin verwendet.

Die Substratkonzentration wurde je nach Aktivität der untersuchten Proben variiert, da t-RNA in hohen Konzentrationen t-RNA-Methyltransferasen hemmt. Kersten et Kersten 1974 (24).

Der Ansatz setzte sich wie folgt zusammen:

50 ul	TMMG Puffer (0,1 M Triäthanolamin/HCl pH 8 0,02 M 2-Mercaptoäthanol 0,01 M Magnesiumchlorid)
50 ul	t-RNA Lösung 0,2 - 2 OD ₂₆₀
50 ul	Enzym Lösung 5 - 100 ug im Ansatz
10 ul	^{14}C -S-Adenosyl-Methionin (SAM) 0,05 uCi / 16 nMol oder 0,2 uCi / 19 nMol

Inkubiert wurde bei 37°C für 60 - 120 Min. Die Entnahme von 100 μ l wurde auf ein Filterplättchen (Whatman 3 MM) pipettiert und das Filter 20 sec. im heißen Luftstrom getrocknet. Die Plättchen wurden ca. 30 Min. in eiskalter 10 % Trichloressigsäure (TCA) fixiert und anschließend wie folgt gewaschen.

- dreimal eiskalte 5 % TCA, jeweils 5 Min.
- zweimal eiskalte Äthanol Waschflüssigkeit, je 5 Min.
(2300 ml Äthanol/ 120 ml Eisessig/
1,6 ml 10 n Natronlauge)
- einmal eiskalter Äther 10 Min.

Die Filterplättchen müssen während des Waschvorganges bei jedem Wechsel der Waschflüssigkeit auf Filterpapier ausgelegt werden. Nach dem Trocknen bei 60°C im Trockenschrank (30 Min.) wird die Radioaktivität mit Toluolszintillator im Szintillationszähler bestimmt. Nähere Einzelheiten siehe Mans und Novelli 1961 (31).

Messung der Methyltransferase Aktivität mit spezifischer t-RNA

Die Anfangsgeschwindigkeit einer Methylierungsreaktion ist ein Maß für die Aktivität, wobei nur der Anstieg im ersten (linearen) Teil der Kurve maßgebend ist. Der Ansatz setzte sich wie folgt zusammen:

- 50 μ l TMMG Puffer
- 50 μ l t-RNA Lösung (0,1 OD₂₆₀ B. subtilis t-RNA^{Met}_f)
- 50 μ l Enzym Lösung (5 - 250 μ g Protein)
- 10 μ l ¹⁴C-S-Adenosyl-Methionin (0,2 μ Ci / 19 nMol)
- 20 μ l 0,05 M Tris/HCl Puffer pH 8

Es wurden schrittweise mehrere Entnahmen von 50 μ l zu gegebenen Zeiten durchgeführt. Soweit nichts anderes angegeben wurde nach 10, 20 und 30 Min. entnommen. Die

Behandlung der Filterplättchen wurde wie oben vorgenommen. Die Initiator t-RNA aus *B. subtilis* (t-RNA_f^{Met}) kann als spezifisches Substrat für die t-RNA (Guanin-7) Methyltransferase aus *E. coli* verwendet werden (siehe Ergebnisse).

2.7. Basen- und Nucleotidanalyse

In *E. coli* kommen außer 7-Methyl-Guanin und 5-Methyl-Uracil noch kleinere Mengen anderer methylierter Komponenten vor, wie z.B. 2-Methyl-Adenin, 6-Methyl-Adenin, 5-Methylaminomethyl-2-thio-Uracil u.a. vor, die in unmethylierter t-RNA aus *E. coli* fehlen. Die in vitro mit einzelnen Proteinfractionen in Gegenwart von ¹⁴C-SAM methylierte t-RNA wird für die Produktanalyse durch Säure oder enzymatisch hydrolysiert und das Hydrolysat durch zweidimensionale Dünnschichtchromatographie aufgetrennt.

Die Hydrolyse der t-RNA zu den Basen wurde mit Perchlorsäure und die weitere Verarbeitung der Produkte nach der Methode von Kahle et al. 1971 (22) modifiziert nach Arnold 1973 (2) durchgeführt.

Die Hydrolyse der methylierten t-RNA mit Ribonuclease T₂ und die nachfolgende Analyse der Nucleotide wurde nach der Methode von Nishimura 1973 (37) durchgeführt.

2.8. Proteinbestimmung

In Proteinlösungen die noch Nucleinsäuren enthielten, z.B. Rohextrakt, wurde die Proteinbestimmung nach Lowry et al. 1951 (30) durchgeführt.

Bei reinen Proteinlösungen wurde der Gehalt durch Messung im UV bei 215,5 und 225 nm bestimmt. Murphy et al. 1960 (35) In allen Fällen diente Rinder-Serum-Albumin als Standard.

2.9. Polyacrylamid Gelelektrophorese

Zur Reinheitsprüfung der gewonnenen Proteinfractionen wurde die Gelelektrophorese verwendet. Ein Standard-System für solche Zwecke ist das bei Maurer beschriebene System 1a (33).

Die bei der Enzymanreicherung anfallenden Fraktionen mit t-RNA Methyltransferase Aktivität wurden mit der diskontinuierlichen Gelelektrophorese untersucht.

Die Gele hatten folgende Zusammensetzung:

1.) Sammelgel 2,0 % Polyacrylamid
Puffersystem: Tris/HCl pH 8,9

2.) Trenngel 5,7 % Polyacrylamid
Puffersystem: Tris/HCl pH 6,7

Die Elektrophorese wurde in einer Apparatur nach Shandon () durchgeführt. Im Verlauf der Trennung wird die Stromstärke schrittweise erhöht, die maximale Belastung der Röhrchen lag bei 1,5 mA/Rö. Nach dem Entfernen der Gele aus den Glasröhrchen wurden die Proteine mit 0,25 % Coomassie Brilliant Blue G 250 in Methanol/ Eisessig/ Wasser (125/375/4500 ml) angefärbt.

Diese Art der Anfärbung ist für die untersuchten Proteine empfindlicher als die vielfach verwendete Färbung mit Amidoschwarz und die Farbe hält sich länger.

Die Entfärbung der Gele wurde mit folgender Lösung bei 60°C im Trockenschrank durchgeführt: Methanol/Eisessig/ Wasser (125/375/4500 ml)

Ergeben sich bei der Elektrophorese mehrere Proteinbanden, so muß geklärt werden in welcher Bande die Enzymaktivität zu finden ist. Die Elektrophorese wurde in einer gekühlten Kammer (siehe Anhang) bei 0°C durchgeführt. Von einer Fraktion wurden mehrere Gele unter identischen Bedingungen

angefertigt. Das Entfernen der Gele aus den Glasrohren wurde im Kühlraum vorgenommen und bei einem Gel die gelungene Trennung mit einer Schnellfärbung nach Udenfriend 1969 (49) kontrolliert.

Ein unbehandeltes Gel wurde mit einem Gelschneider nach Aronson et al. 1967 (5) in Scheibchen von 2 mm Stärke zerschnitten. Bei einer Laufstrecke von 55 mm und einer Schnittbreite von 2 mm ergeben sich so 28 Gelstücke, die anstelle der Enzymlösung in den Methyltransferase Test gegeben wurden. Die enzymatisch aktiven Banden wurden den Proteinbanden in dem gefärbten Referenz-Gel zugeordnet.

2.10. Molekulargewichtsbestimmung durch Diffusionschromatographie an Sephadex G 200

Um die Größenordnung der Molekulargewichte von gereinigten Enzymen zu bestimmen, wurde die Diffusionschromatographie nach Andrews 1965 (1) gewählt. Zur Eichung der Säule wurden Proteine verwendet, deren Molekulargewicht bekannt ist, und die in reiner Form im Handel sind. Es wurden folgende Substanzen verwendet: Ferritin, Katalase, Transferrin und Hydroxynitrillase. Die Säule wurde wie folgt gewählt:

Länge: 40 cm, Ø 0,5 cm, Durchsatz 0,84 ml/h
 Puffer: 0,05 M Sörensen Phosphat pH 8,0
 0,5 mM 2-Mercaptoäthanol

Die Säule wurde mindestens 48 h mit dem Puffer äquilibriert und dann mit den Eichsubstanzen vermessen. Es wird die Zeit bestimmt, die von der Aufgabe auf die Säule bis zum Erscheinen im Fraktionsgläschen vergeht. Es wurden Fraktionen von 60 Min. gesammelt.

Da bei der Enzymlösung wegen der hohen Verdünnung keine optische Messung mehr möglich war, wurde hier der Methyl-

transferase Test (2.6.) eingesetzt um das eluierte Enzym in den Fraktionen wiederzufinden.

3. Ergebnisse

3.1. Anreicherungsversuche von t-RNA Methyltransferasen durch Affinitätschromatographie an t-RNA Sepharose 4B

Für die im folgenden beschriebenen Versuche wurde eine t-RNA Sepharose verwendet, die 1,8 mg t-RNA/ml Gel enthielt. Als Substrat für die Methyltransferase Tests wurde untermethylierte Gesamt t-RNA aus *E. coli* verwendet. Die Daten der verwendeten Säule sind aus Abb. 5 zu entnehmen. 137 mg Protein der entsalzten Proteinfraction B wurden in 12 ml 0,05 M Tris/HCl Puffer pH 8,0 aufgetragen. Dabei wird ein Teil der Proteine von der Säule nicht gebunden und mit dem Auftragspuffer ausgespült (Abb. 5, Fraktionen im Bereich A). Ab Fraktion 20 wurde mit einem linearen Gradienten von 0 - 0,1 M Sörensen Phosphat Puffer pH 8,0 über 24 Stunden eluiert (Bereich B). Anschließend daran wurde in einem Schritt die Phosphat Puffer Konzentration von 0,1 auf 0,5 M erhöht und der pH Wert auf 6,5 erniedrigt.

Für die Elution wurde Phosphat-Puffer gewählt, da Phosphat im Gegensatz zu anderen Puffersubstanzen die t-RNA Methyltransferasen nicht hemmt.

Von den einzelnen Fraktionen wurden Proben entnommen (50 μ l) und auf t-RNA Methyltransferase Aktivität mit untermethylierter Gesamt t-RNA aus *E. coli* geprüft.

Zur Lokalisierung spezifischer Methyltransferasen im Elutionsverlauf wurde untermethylierte Gesamt t-RNA mit bestimmten Fraktionen und ^{14}C -SAM methyliert, die substituierte t-RNA hydrolysiert und die jeweils erhaltenen Basengemische dünnschichtchromatographisch getrennt. Das Ergebnis ist in Tab. 2 wiedergegeben.

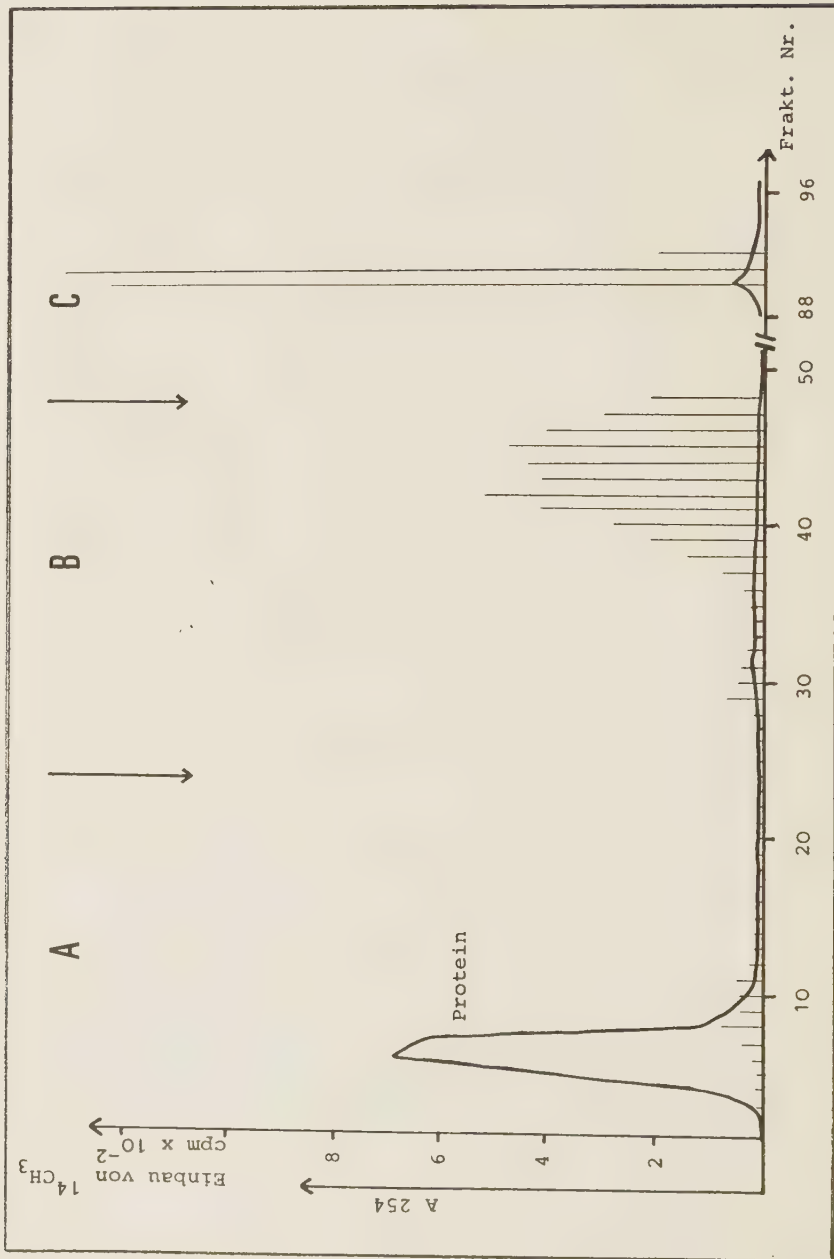


Abb. 5

Affinitätschromatographie von Proteinfraktion B an t-RNA Sepharose

Säule: l = 120 mm, $\varnothing$ = 16 mm, Durchfluß = 13 ml/h

Gelbett: t-RNA Sepharose, 30 mg t-RNA an 16,6 ml Gel $\hat{=}$ 1,8 mg t-RNA/ml Gel

Auftrag: 137 mg entsalzte Proteinfraktion B in 12 ml 0,05 M Tris/HCl pH 8

A = Auftrag von Proteinfraktion B in 0,05 M Tris/HCl pH 8

B = Gradient von 0,05 M Tris/HCl pH 8 - 0,1 M Sörensen Phosphat pH 8
über 24 h, Fraktionen 24 - 48

C = 0,5 M Sörensen Phosphat pH 6,5 (Step)

| : Methylierung von 2 OD₂₆₀ nm untermethylierter Gesamt t-RNA unter Standard
Bedingungen (cpm pro 2 OD₂₆₀ nm, 10 ug Protein und 0,05 uCi SAM /16 nMol.
Ansatzvolumen 160 ul, Entnahme 100 ul nach 120 Min.)

	m^5U	m^2A/m^6A	m^1G/m^7G	X	V	Div.
Protein- fraktion B	51	1,0	45	-	-	3
Durchlauf (vereinigte Frakt. 1-20)	0,3	11,5	83,2	4,7	-	-
Frakt. 29	0,6	36,9	59,3	0,7	2	-
33	0,3	21,7	75,6	2,1	-	0,3
37	0,4	19,6	73,6	6,3	-	-
41	0,1	9,8	80,7	8,4	-	0,7
45	-	7,9	86,3	5,4	-	-
49	-	5,7	93,6	0,5	-	0,2
91	3,1	15,5	43,3	31,5	2,2	4,4

Tab. 2

Basenanalysen der mit verschiedenen Proteinfractionen und ^{14}C SAM methylierten t-RNA. Relative Verteilung der Radioaktivität auf einzelne methylierte Basen in % . Abkürzungen der methylierten Basen siehe Einleitung; die Basen X und V sind nicht identifiziert.

Die in Proteinfraction B vorhandenen Methyltransferasen methylieren in untermethylierter Gesamt t-RNA hauptsächlich Uracil zu m^5U und Guanin zu m^1- bzw. m^7G , daneben entsteht u.a. etwas m^2- bzw. m^6 Adenin.

Bei Auftrag dieser Proteinfraction B auf die t-RNA Matrix passieren ca. 90 % der Proteine die Säule ohne Fixierung. Die unter diesen Bedingungen nicht gebundenen Methyltransferasen (Durchlauf, Frakt. 1 - 20) methylieren im eingesetzten Substrat hauptsächlich Guanin.

Die an die Matrix gebundenen Proteine lassen sich zunächst im steigenden Phosphat-Gradienten von 0 - 0,1 M bei pH 8,0 ablösen. Wie Tab. 2 zeigt sind Guanin und Adenin methylierende Aktivitäten in allen Fraktionen, prozentual jedoch unterschiedlich verteilt, vorhanden. Adenin methylierende Aktivitäten werden zu Beginn des Gradienten eluiert. Eine Enzymaktivität die zu dem noch nicht identifizierten Produkt "X" führt, tritt in Gradientenmitte auf. Am Gradientenende wird nahezu ausschließlich Guanin methylierende Aktivität von der Matrix abgelöst.

Im anschließenden Elutionsschritt mit 0,5 M Phosphat treten bei pH 6,5 wiederum G und X methylierende Aktivitäten auf, die offenbar fester an die Matrix gebunden waren.

Nach Auftrag von Proteinfraction B auf t-RNA Sepharose wird sämtliche Uracil-5 Methyltransferase Aktivität gebunden. Sie läßt sich jedoch unter den beschriebenen Bedingungen so gut wie nicht eluieren. Das Enzym könnte an die Matrix gebunden bleiben, oder aber während der Elution denaturiert werden.

Daß nach Elution mit 0,1 M Sörensen Phosphat Puffer pH 8 noch m^5U Methyltransferase Aktivität auf der t-RNA Matrix verblieben ist, zeigt folgendes Experiment. Man belädt t-RNA Sepharose mit Proteinfraction B und eluiert wie in Abb.8 angegeben. Danach wird mit einem Mikrospatel eine kleine Menge (ca. 100 μ l Gelvolumen) Säulenmaterial entnommen und dieser Matrix-t-RNA-Methyltransferase Komplex als Enzymaktivität im Standard Methyltransferase Test eingesetzt.

Überraschenderweise methyliert der eingesetzte Komplex untermethylierte Gesamt t-RNA aus E. coli. Wie die Produktanalyse der methylierten t-RNA (Abb. 6) zeigt, enthält er neben m^5U auch noch m^7G -Methyltransferase und eine Aktivität, die zu dem bisher nicht identifizierten Produkt X führt.

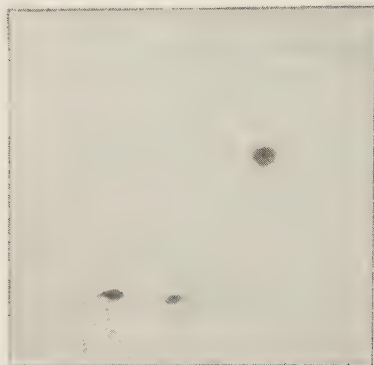


Abb. 6

Analyse der methylierten Basen von t-RNA, die mit Matrix-gebundenem Protein und ^{14}C -SAM methyliert war.

Anteile an gebildetem Produkt in % :

$\text{m}^1\text{G}/\text{m}^7\text{G}$	38,4
m^5U	48,2
X	13,4

3.2. Versuche zur Anreicherung einer t-RNA (Uracil-5) Methyltransferase

Unter den in Abb. 5 beschriebenen Bedingungen wird die in Proteinfraction B enthaltene m^5U -Methyltransferase Aktivität vollständig an die t-RNA Sepharose gebunden und ist so gut wie nicht eluierbar (vergl. Tab. 2). Am Ende der Elution enthält die Matrix noch aktive m^5U Methyltransferase Aktivität.

Durch Änderung der Elutionsbedingungen hinsichtlich

Ionenart

Ionenkonzentration

Pufferzusammensetzung

und pH Wert

sollte nun versucht werden, die auf der Matrix haftende restliche Methyltransferase Aktivität abzulösen.

Das Ergebnis dieser Versuche ist in Abb. 7 a und b schematisch zusammengefasst.

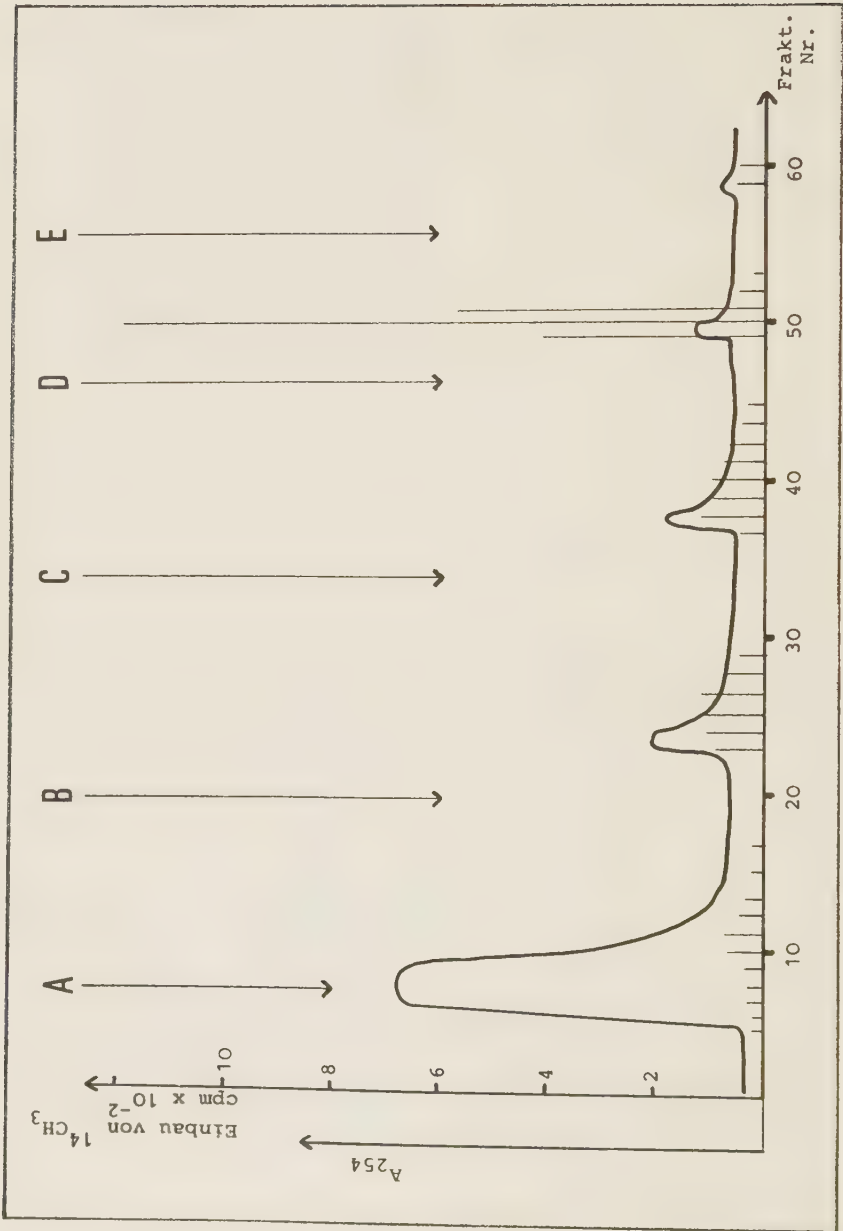


Abb. 7 a

Affinitätschromatographie von Proteinfraktion B an t-RNA Sepharose

Säule: l = 142 mm, $\emptyset$ = 23 mm, Durchfluß = 17,8 ml/h

Gelbett: t-RNA Sepharose, 130 mg t-RNA an 59,1 ml Gel, $\hat{=}$ 2,2 mg t-RNA/ml Gel

Auftrag: 412,3 mg Protein (entsalzte Proteinfraktion B) in 35 ml 0,05 M Tris/HCl pH 8,0

Bereich A: Auftrag von Proteinfraktion B

B:	Elution mit 0,04 M Sörensen Phosphat	pH 8,0
C:	Elution mit 0,1 M "	pH 8,0
D:	Elution mit 0,5 M "	pH 6,5
E:	Elution mit 0,5 M "	pH 4,3

| : Methylierung von 2 OD₂₆₀ untermethylierter Gesamt t-RNA unter Standard Bedingungen (cpm pro 2 OD₂₆₀, 50 ul Eluat und 0,05 uCi SAM / 16 nMol. Ansatzvolumen 160 ul, Entnahme 100 ul nach 120 Min.)

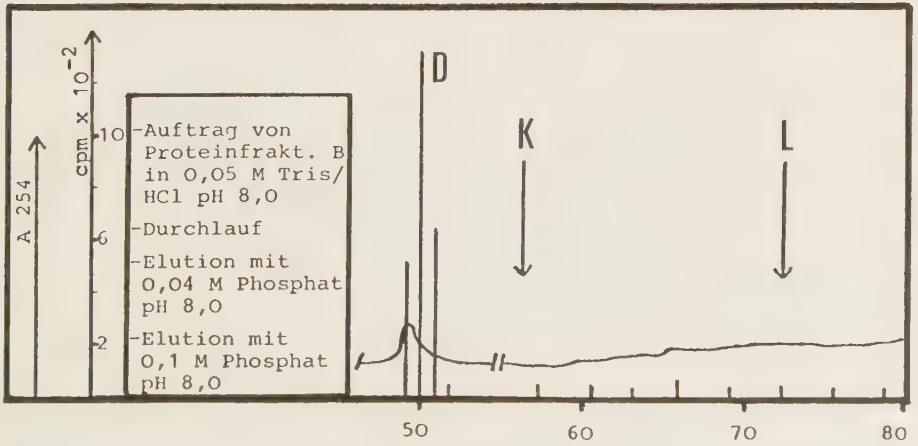
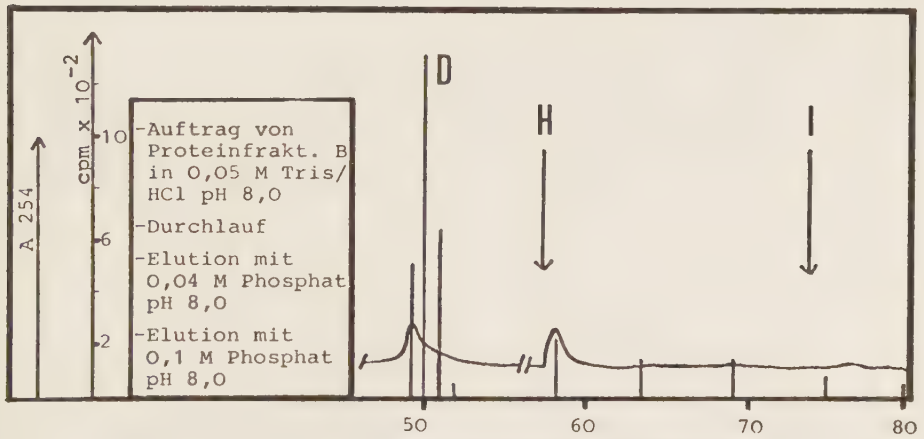
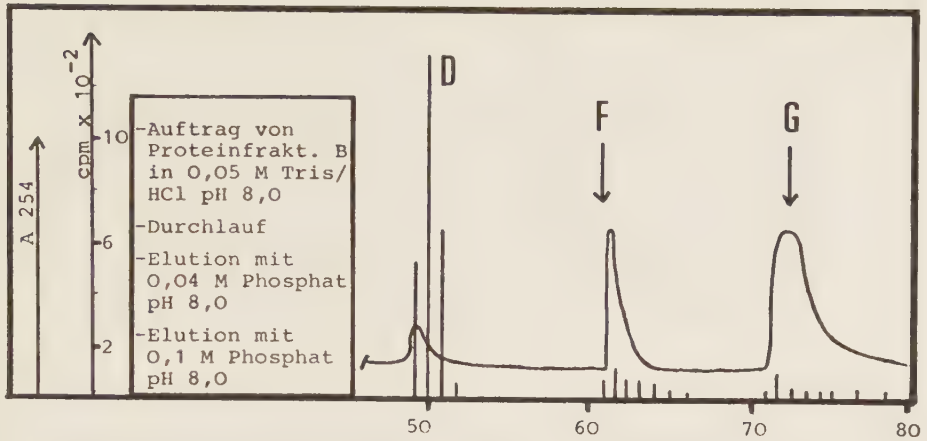


Abb. 7 b

Schematische Übersicht über weitere Versuche zur Isolierung von t-RNA (Uracil-5) Methyltransferase mit der Affinitätschromatographie.

Für jede der drei gezeigten Chromatographien wurde eine t-RNA Sepharose Säule mit Proteinfraction B beladen und bis einschließlich 0,1 M Phosphat pH 8,0 eluiert.

Chromatographie und Testbedingungen waren analog Abb. 7 a.

oberes Bild:

- Bereich D, Elution mit 0,5 M Sörensen Phosphat pH 6,5
(Fraktionen 46 - 55)
- Bereich F, Elution mit 0,2 M Na-acetat pH 4,3 , 2,5 M NaCl. (Fraktionen 56 - 67)
- Bereich G, Elution mit 0,05 M Tris/HCl pH 8,0
(Fraktionen 68 - 80)

mittleres Bild:

- Bereich D, Elution mit 0,5 M Sörensen Phosphat pH 6,5
(Fraktionen 46 - 55)
- Bereich H, Elution mit 0,1 M Sörensen Phosphat pH 6,5
anschließend linearer Gradient nach
- Bereich I Elution mit 0,1 M Sörensen Phosphat pH 4,3
(bis Fraktion 74)

unteres Bild:

- Bereich D, Elution mit 0,5 M Sörensen Phosphat pH 6,5
(Fraktionen 46 - 55)
- Bereich K, Elution mit 0,1 M Na-acetat pH 6,5
anschließend linearer Gradient nach
- Bereich L, Elution mit 0,1 M Na-acetat pH 4,0
(bis Fraktion 73)

Die Wertung der in diesem Kapitel beschriebenen Experimente zeigt, daß sich unter den angegebenen, zum Teil sehr radikalen Bedingungen, keine weiteren enzymatisch aktiven Methyltransferase Aktivitäten von der t-RNA Sepharose ablösen lassen. Offenbar wird die ursprünglich verbliebene Enzymaktivität an der Matrix bei diesen Elutionen denaturiert. Die Versuche zur weiteren Isolierung von t-RNA (Uracil-5) Methyltransferase wurden an dieser Stelle abgebrochen.

3.3. Anreicherung einer t-RNA (Guanin-7) Methyltransferase

Das Schwergewicht der weiteren Experimente wurde jetzt auf die Gewinnung von möglichst reiner m^7G Methyltransferase gelegt. Grundlage dazu bildeten die in Abb. 5 angegebenen Trennbedingungen. Sie wurden jetzt wie folgt modifiziert.

- Erhöhung des Substitutionsgrades der Sepharose durch Verwendung von reinstem Hydrazin zur t-RNA Koppelung.
- Einsatz von Sepharose, die statt 1,8 mg jetzt 5,7 mg t-RNA / ml Gel enthielt.
- Auftrag von größeren Mengen Proteinfraction B pro Menge gebundener t-RNA.
- Stufen- statt bisheriger Gradientenelution.
- Einsatz von t-RNA_f^{Met} aus *B. subtilis* als spezifischem Substrat, neben untermethylierter Gesamt t-RNA aus *E. coli*.

Ein typischer Reinigungsverlauf von Proteinfraction B unter diesen Bedingungen ist in Abb. 8 wiedergegeben.

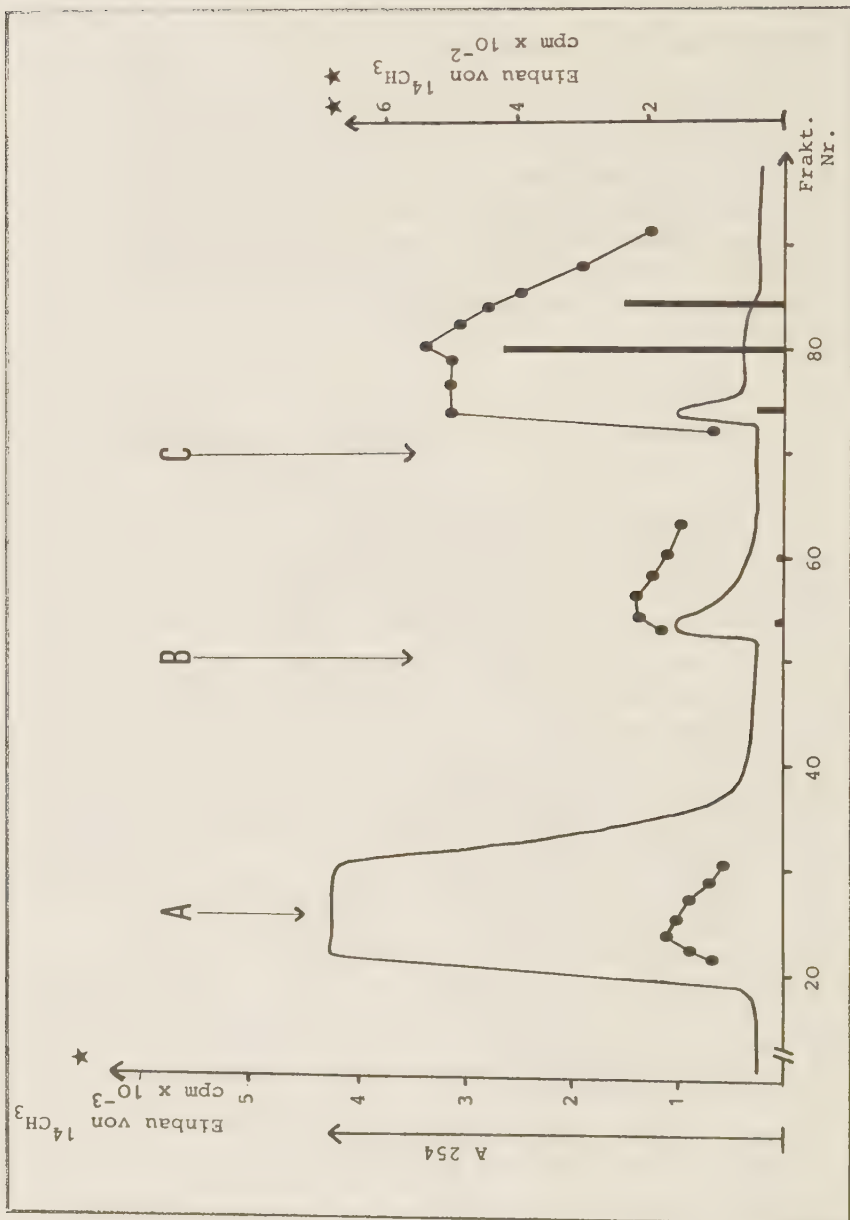


Abb. 8

Affinitätschromatographie von Proteinfraction B an t-RNA Sepharose

Säule: 1 = 40 mm, ϕ = 9 mm, Durchfluß = 3,3 ml/h

Gelbett: t-RNA Sepharose, 15,4 mg t-RNA an 2,71 ml Gel $\approx$ 5,7 mg t-RNA/ml Gel

Auftrag: 848 mg Protein der entsalzten Proteinfraction B in 85 ml 0,05 M Tris/HCl pH 8,0

Bereich A : Auftrag von Proteinfraction B

B : Elution mit 0,04 M Sörensen Phosphat pH 8,0

C : Elution mit 0,1 M " " pH 8,0

★ / ●-●-●-●-● : Methylierung von 1 OD₂₆₀ untermethylierter Gesamt t-RNA unter Standard Bedingungen (cpm pro 1 OD₂₆₀, 50 ul Eluat und 0,05 uCi SAM/ 16 nMol. Ansatzvolumen 160 ul, Entnahme 100 ul nach 120 Min.)

★★ / | : Inkorporation von ¹⁴C-Methylgruppen, gemessen mit dem Methylierungsansatz für Aktivitätsbestimmungen. (cpm pro 0,1 OD₂₆₀ t-RNA_f Met aus B. subtilis, 5 ug Protein und 0,2 uCi SAM/ 19 nMol. Ansatzvolumen 180 ul, Entnahme 50 ul nach 10 Min.)

Analog Abb. 5 passieren bei Beladung und Nachwaschen ca. 90 % der Proteine von Proteinfraktion B die Gel-säule. Der überwiegende Teil der Methyltransferase-Aktivität wird dagegen von der Matrix fixiert. Schrittweise Elution mit 0,04 M Sörensen Phosphat Puffer pH 8,0 bzw. 0,1 M Sörens. Phosphat pH 8,0 führen zur Ablösung von 44 % der gebundenen Protein-anteile ($\approx 3,9$ % des aufgetragenen Proteins). Es wurden Fraktionen von 3,3 ml gesammelt und jeweils 50 μ l davon mit untermethylierter Gesamt t-RNA (E.coli) auf Methyltransferase Aktivität untersucht. Dabei ergab sich Enzymaktivität im gesamten Elutionsbereich von Fraktion 55-85. Die Bestimmung der Methyltransferase Aktivität in einigen ausgewählten Fraktionen mit t-RNA_f^{Met} (B. subtilis) als Substrat, ergab nennenswerte Enzymaktivitäten dagegen nur im Gebiet der Fraktionen 78 - 85. Die t-RNA_f^{Met} aus B. subt. wurde hier als Substrat eingesetzt, da in diese t-RNA mit Enzymextrakten aus E. coli Methylgruppen (m^7G , C_m) eingeführt werden können. Die Fraktionen 78-85 wurden vereinigt und für die weiteren Untersuchungen verwendet. Sie werden im folgenden als "gereinigte Methyltransferase" bezeichnet.

3.3.1. Stabilisierung und Lagerung von Proteinen mit Methyltransferase Aktivität

In Übereinstimmung mit der Literatur (Nau 1976) erwiesen sich die von der t-RNA Sepharose eluierten Methyltransferasen bei Lagerung in Puffer bei 0°C als instabil. Es wurde ein deutlicher Abfall der Aktivität schon binnen weniger Tage gefunden.

Da die Proteinkonzentrationen der Eluate sehr gering waren, wurde auf eine Stabilisierung mit Glycerin (Zusatz von 50 % Glycerin und Lagerung bei - 20°C) aus Gründen der damit verbundenen Verdünnung verzichtet.

Dagegen erwies es sich als sehr erfolgreich, Methyltransferase Aktivitäten durch Schockgefrieren bei - 196°C in

flüssiger Luft zu stabilisieren. Dabei wurden die vereinigten Fraktionen 78-85 (Abb. 8) in Volumina von 500 μ l in Kunststoff-Caps aufgeteilt und in flüssiger Luft eingefroren. Eine Lagerung bei -70°C bzw. -45°C nach dem Schockgefrieren zeigte gegenüber der aufwendigeren Lagerung in flüssiger Luft keinen messbaren Abfall der Methyltransferase Aktivität über mehrere Monate.

Lagerung bei -18°C führte dagegen zur Enzymdenaturierung in kurzer Zeit.

Beim Auftauen der auf -70°C (bzw. -45°C) eingefrorenen Proben ist es sehr wichtig, daß nach dem Antauen in der Hand, der Capinhalt nicht über 0°C kommt. Allerdings muß eine einmal aufgetaute Probe baldigst verbraucht werden, da nach dem Auftauen eine rasche Denaturierung der Methyltransferasen erfolgt (Abb. 9)

Damit war eine weitere Reinigung einer einmal eingefrorenen Proteinlösung nicht möglich.

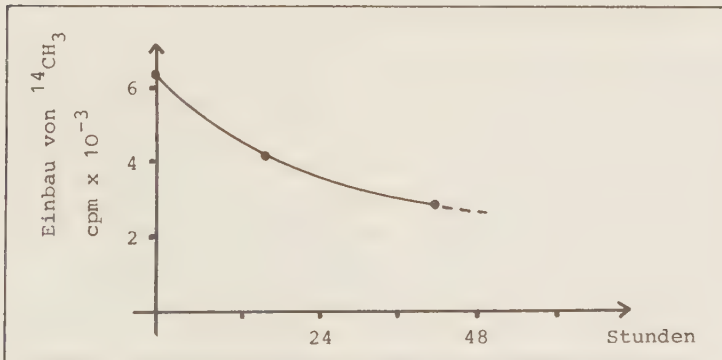


Abb. 9

Inaktivierung von "gereinigter Methyltransferase" (vergl. Abb. 8, Fraktion 78-85). Schockgefrorene Lösung aufgetaut und bei 0°C gelagert. Messung der Methyltransferase Aktivität mit untermethylierter Gesamt t-RNA (E. coli) unter Standard Bedingungen (cpm pro 2 OD_{260} t-RNA, 50 μ l Proteinlösung $\approx$ 5,4 μ g Protein und 0,2 μCi / 19 nMol SAM; Ansatzvolumen 160 μ l, Entnahme 100 μ l nach 120 Min.).

3.3.2. Untersuchung der durch Affinitätschromatographie gewonnenen Proteinfraktionen

Für die im folgenden beschriebenen Untersuchungen wurden vorwiegend die veräinigten Fraktionen 78 - 85 (gereinigtes Enzym aus Versuch 3.3.) verwendet. Zusätzlich wurden noch zwei Fraktionen (55, 73) untersucht. Nach dieser Auftrennung von Proteinfraktion B sollten folgende Fragen geprüft werden:

- 1.) welche spezifischen t-RNA Methyltransferasen sind eluiert und von anderen abgetrennt worden ?
- 2.) wie hoch ist die Anreicherung der Methyltransferase Aktivität gegenüber der des Ausgangsmaterials ?

Methylierung von E. coli t-RNA und Analyse der methylierten Basen

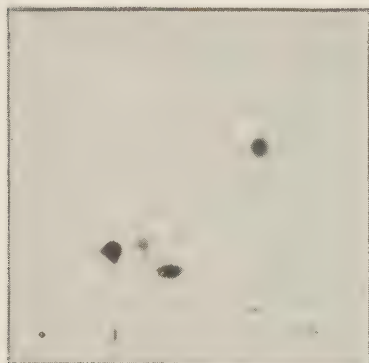
Für die Analyse der Basenspezifität der getrennten Methyltransferasen wurde zunächst untermethylierte Gesamt t-RNA aus E. coli als Substrat verwendet. Dazu wurde das Ansatzvolumen des Standard Methyltransferase Testes um den Faktor 2,5 erhöht und damit 5 OD₂₆₀ t-RNA zur Bestimmung eingesetzt. Die Hydrolyse der methylierten t-RNA mit Perchlorsäure, die anschließende Reinigung der Basen, schließlich die zweidimensionale Auftrennung auf Dünnschichtplatten und die Detektion der radioaktiven Flecken mit Röntgenfilmen wurde nach 2.7. durchgeführt. In der folgenden Abbildung sind die Produkte dargestellt, die nach Methylierung der t-RNA mit einzelnen Fraktionen der affinitiven Trennung und ¹⁴C-SAM erhalten wurden. Zusätzlich ist das Ergebnis der Produktanalyse gezeigt, welche nach Methylierung von t-RNA mit Proteinfraktion B als Ausgangsmaterial erhalten wurde.



Proteinfraktion B



Fraktion 55



Fraktion 73



Fraktion 78-85

Abb. 11

Ergebnis der Produktanalysen, die mit Proteinfraktion B, den Fraktionen 55 und 73 und dem gereinigten Enzym (Frakt. 78-85) nach Methylierung von untermethylierter Gesamt t-RNA (*E. coli*) und ^{14}C -SAM erhalten wurde

	m^5U	m^2A/m^6A	m^1G/m^7G	Div.
Proteinfraktion B	51,0	1,0	45,0	3,0
Fraktion 55	-	-	100,0	-
73	-	1,6	48,0	50,4
78-85	-	-	100,0	-

Tab. 3

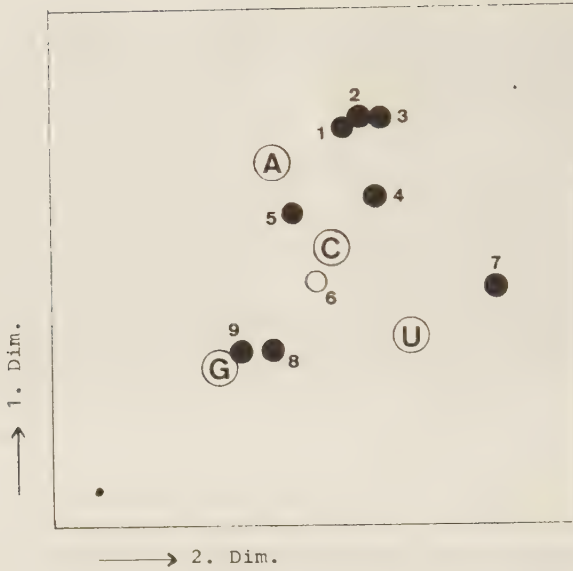
Relative Verteilung der Radioaktivität auf einzelne methylierte Basen in %. Substrat = untermethylierte Gesamt t-RNA aus *E. coli*

Nach Methylierung von untermethylierter Gesamt t-RNA mit Enzymaktivitäten aus Fraktion 55 und 78-85 (gereinigtes Enzym) ergeben sich nach Hydrolyse der $^{14}CH_3$ markierten Nucleinsäuren und dünnenschichtchromatographischer Auftrennung in beiden Fällen nur ein "Fleck". Ob auch nur ein Produkt entstanden ist, kann nicht entschieden werden, da 1-Methyl-Guanin und 7-Methyl-Guanin in diesem System nicht getrennt werden. Dazu kommt, daß bei dieser Analyse nur die methylierten Basen, nicht aber eventuelle Ribose-Methylierungen erfasst werden.

Abbau der $^{14}CH_3$ -methylierten Substrate aus *E. coli* und *B. subtilis* zu Nucleotiden

Baut man die $^{14}CH_3$ -methylierten Substrate statt einer Totalhydrolyse mit Perchlorsäure mit Ribonuclease T_2 nur zu Nucleotiden ab, so ist es möglich im Autoradiogramm auch methylierte und damit markierte Ribosen zu erfassen Nishimura 1973 (37).

Ein derartiger T_2 -Abbau der im vorhergehenden Kapitel erhaltenen methylierten t-RNAs ergab folgende Ergebnisse.



- | | |
|-------------------------------------|--------------------------|
| 1 = m ⁶ A p | 6 = C _m p U p |
| 2 = m ² A p | 7 = m ⁵ U p |
| 3 = m ⁶ ₂ A p | 8 = m ² G p |
| 4 = m ⁵ C p | 9 = m ¹ G p |
| 5 = m ⁷ G p | |

Abb. 12

Schema zur Auswertung von Nucleotidanalysen nach Hydrolyse von methylierter t-RNA mit Ribonuclease T₂.

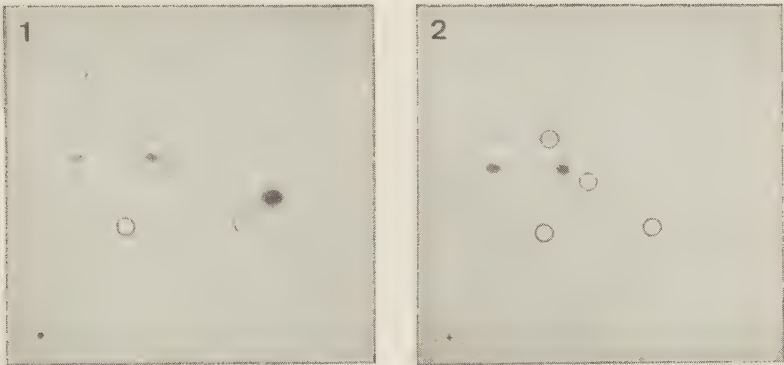


Abb. 13

Autoradiogramm der $^{14}\text{CH}_3$ markierten Nucleotide nach Methylierung von untermethylierter Gesamt t-RNA aus *E. coli* und Abbau mit RNase T_2

- 1.) Methylierung mit Proteinfraction B
- 2.) Methylierung mit Fraktion 78-85 nach Auftrennung von Proteinfraction B an t-RNA Sepharose (3.3.)

Arnold hatte beobachtet, daß Methyltransferasen aus *E. coli* (Proteinfraction B, Rohextrakt S-100) in Gesamt t-RNA aus *B. subtilis* Methylgruppen einbauen (Arnold unveröff.)

Bei Einsatz von $\text{t-RNA}_f^{\text{Met}}$ aus *B. subtilis* (vgl. Abb. 8) konnte gezeigt werden, daß die in Fraktion 78 - 85 enthaltenen abgetrennten *Coli* - Methyltransferasen diese als Substrat akzeptieren.

Wird $\text{t-RNA}_f^{\text{Met}}$ aus *B. subtilis* nach Methylierung mit Proteinfraction B und Methyltransferasen aus Fraktion 78 - 85 und ^{14}C -SAM auf $^{14}\text{CH}_3$ markierte Nucleotide untersucht, so ergeben sich nachstehende Autoradiogramme.

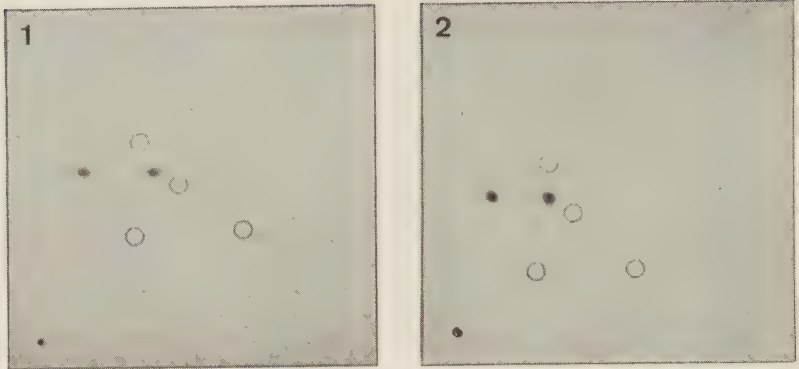


Abb. 14

Autoradiogramm der $^{14}\text{CH}_3$ markierten Nucleotide nach Methylierung von $\text{t-RNA}_{\text{f}}^{\text{Met}}$ aus *B. subtilis* und Abbau mit RNase T_2 .

- 1.) Methylierung mit Proteinfraction B
- 2.) Methylierung mit Fraktion 78-85 nach Auftrennung von Proteinfraction B an t-RNA Sepharose (3.3.)

Damit führen Methylierungen mit Methyltransferasen aus Fraktion 78-85 (3.3.) sowohl nach Umsatz mit unter-methylierter Gesamt t-RNA aus *E. coli*, als auch mit spezifischer $\text{t-RNA}_{\text{f}}^{\text{Met}}$ aus *B. subtilis* zu den gleichen methylierten Produkten in den betreffenden Nucleinsäuresubstraten.

Nach dem von Nishimura (37) angegebenen System zur Trennung und Identifizierung von Nucleotiden ergibt sich:

- Bei der in Fraktion 78-85 (3.3.) enthaltenen Enzymaktivität handelt es sich um eine t-RNA (Guanin-7) Methyltransferase.
- Es wird kein 1-Methyl-Guanin gebildet.
- Ein weiteres bekanntes Produkt entsteht nicht.
- Es tritt ein zusätzliches unbekanntes methyliertes Nucleotid auf, das von seiner Lage im Chromatogramm her keinem bisher bekannten methylierten Produkt zuzuordnen ist.

Dieses Produkt wurde unter ähnlichen Bedingungen schon von Marinus et al. 1975 (32) beobachtet. Wie er konnten auch wir zeigen, daß es sich bei dem unbekannten methylierten Körper um ein Oligonucleotid handelt, das bei einem unvollständigen Abbau der t-RNA durch RNase T₂ entsteht. Nach Verlängerung der Hydrolysezeit von 4 auf 24 h entsteht fast nur noch m⁷G p ; nach Isolierung dieser Substanz aus der Dünnschichtplatte und Hydrolyse mit Ameisensäure wurde 7-Methyl-Guanin gefunden (Abb. 15).

Somit werden in t-RNA_f^{Met} aus *B. subtilis* vom Ausgangsmaterial Proteinfraction B zwei Methylgruppen (C_m und m⁷G) eingebaut. Die über Affinitätschromatographie gewonnene gereingte Methyltransferase Aktivität methyliert in der gleichen t-RNA nur Guanin zu 7-Methyl-Guanin.

Diese t-RNA[★] stellt ein spezifisches Substrat für diese Methyltransferase Aktivität dar.

★ Für ihre großzügige Hilfe bei der Isolierung der t-RNA_f^{Met} möchte ich an dieser Stelle Herrn Dr. Arnold und Herrn Hoburg herzlich danken.

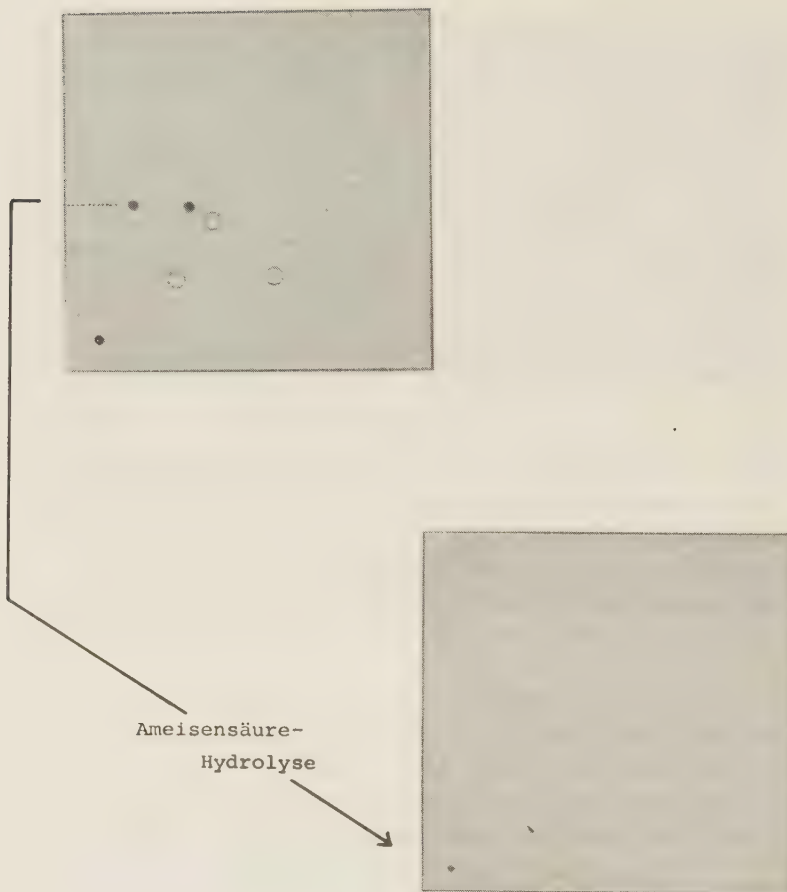


Abb. 15

Identifizierung des unbekannten $^{14}\text{CH}_3$ markierten Produktes aus der Nucleotidanalyse (Abb. 14 / 2), die Hydrolyse mit Ameisensäure ergibt im Fließmittelsystem für Basenanalysen (2.7.) eine markierte Base (m^7G)

Messung der Methyltransferase Aktivität mit spezifischer t-RNA

Um die Anreicherung während der Reinigung zu bestimmen, wurde die Methyltransferase Aktivität von Rohextrakt bzw. Proteinfraction B aus *E. coli* mit t-RNA_f^{Met} aus *B. subtilis* als Substrat gemessen. Der Anstieg der t-RNA Methyltransferase Aktivität in diesem ersten Reinigungsschritt war 4,13-fach, bezogen auf die C_m und m⁷G spez. Methyltransferase (Abb. 16). Der zweite Reinigungsschritt (Affinitätschromatographie) trennt die m⁷G methylierende Aktivität von der C_m methylierenden Aktivität. Kinetische Messungen mit gereinigtem Enzym zeigten einen 202-fachen Anstieg der Aktivität gegenüber der entsalzten Proteinfraction B (Abb. 17).

Die Gesamt-Anreicherung errechnet sich danach zu 835-fach. Sie liegt aber wahrscheinlich höher, weil die Aktivität der Cytidin spezifischen Methyltransferase, die im Rohextrakt bzw. Proteinfraction B vorhanden ist und im letzten Reinigungsschritt abgetrennt wird, nicht exakt bestimmt werden kann.

Die relativ hohe Ausbeute an m⁷G spezifischer Methyltransferase Aktivität (47 %) am Ende der Reinigung kann durch den stabilisierenden Effekt der Matrix gebundenen t-RNA auf die Enzyme erklärt werden.

Da in der Literatur keine einheitlichen Angaben über die Berechnung von Methyltransferase Aktivitäten angegeben sind, wurde für diese Arbeit festgelegt:

"Eine Einheit (U) Methyltransferase Aktivität ist die Menge Protein, die den Einbau von 1 nMol ¹⁴C markierter Methylgruppen pro Minute in t-RNA_f^{Met} unter den beschriebenen Bedingungen katalysiert."

Es ergeben sich danach die in Tab. 4 aufgeführten Werte.

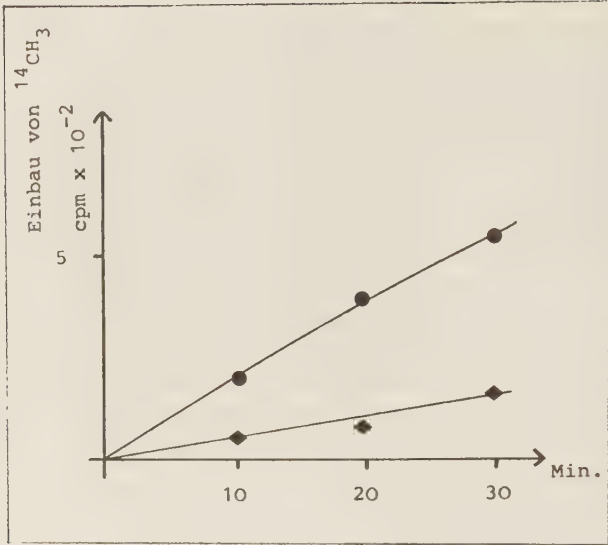


Abb. 16

Methylierung von
0,1 OD₂₆₀ t-RNA_f^{Met}
B. subtilis unter
Standardbedingungen
mit jeweils 250 ug
Protein aus:

Rohextrakt: ◆◆◆

Proteinfrakt. B: ●●●

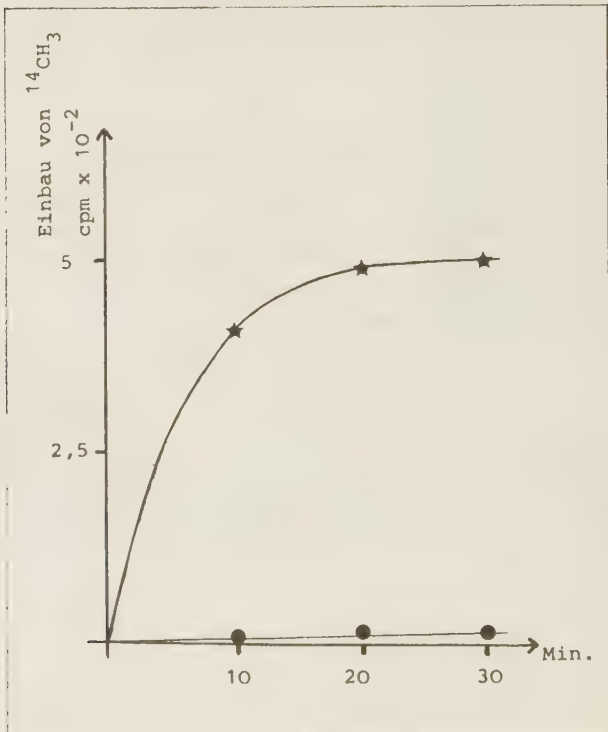


Abb. 17

Methylierung von
0,1 OD₂₆₀ t-RNA_f^{Met}
B. subtilis unter
Standardbedingungen
mit jeweils 5 ug
Protein aus:

Proteinfrakt. B: ●●●

gereinigtes Enzym

(Frakt. 78-85) : ★★

	Protein total	Aktivität total	spezifische Aktivität	Anreicherung		Ausbeute	
				Aktivität		Protein	
Rohextrakt	6332 mg	299,5 U	47,3 mU/mg	-		100 %	100 %
Proteinfrakt. B	848	165,6	195,3	4,13		13,4	55
gereinigtes Enzym (Fraktion 78-85)	3,56	140,6	39494	835		0,06	47

Tab. 4

Anreicherung und Ausbeute der Reinigung der t-RNA (Guanin-7) Methyltransferase
Aktivität aus E. coli über t-RNA Sepharose 4 B.

RPC-5 Auftrennung von in vitro methylierter t-RNA
aus *E. coli* K 12 mit gereinigtem Enzym

Es wurde untersucht, ob bei der Methylierung von unter-methylierter Gesamt t-RNA aus *E. coli* mit gereinigtem Enzym (Frakt. 78-85 aus 3.3.) eine oder mehrere t-RNAs methyliert werden. Dazu wurden 10 OD₂₆₀ t-RNA mit 28 µg gereinigtem Enzym und ¹⁴C-SAM über 120 Min. methyliert. Die t-RNA wurde an einer analytischen RPC-5 Säule nach Raettig 1976 (39) aufgetrennt. In den einzelnen Fraktionen wurde die optische Dichte (260 nm) gemessen und danach die säurefällbare Radioaktivität bestimmt.

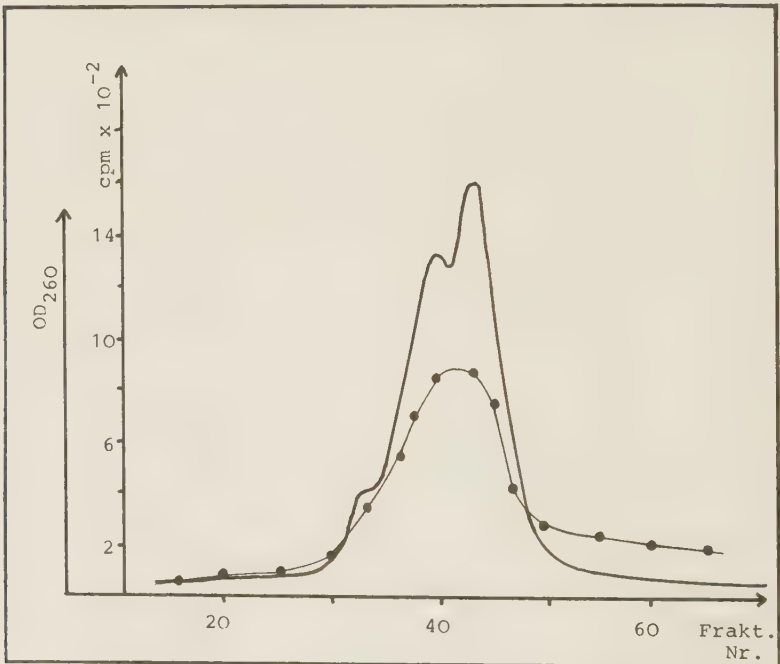


Abb. 18

Chromatographie von 10 OD₂₆₀ methylierter t-RNA (*E. coli*)
im RPC-5 System nach Raettig 1976 (39)

●-●-●-● = OD₂₆₀ ; — = cpm (säurefällbare Radioaktiv.)

Dort wo die OD Kurve ein Maximum zeigt, findet sich auch ein Maximum der säurefällbaren Radioaktivität. Der Vergleich der Kurven zeigt aber auch, daß nicht alle t-RNAs methyliert werden.

Wird untermethylierte t-RNA aus E. coli mit gereinigtem Enzym und ^{14}C -SAM im analytischen Ansatz über 120 Min. methyliert, so akzeptiert im Durchschnitt jede t-RNA 0,6 Methylgruppen (1120 pMol / OD_{260} ; siehe auch Abb. 8 Frakt. 80)

Auch aus diesem Ergebnis geht hervor, daß mehrere t-RNAs (ca. 60 %) mit dem gereinigten Enzym methyliert werden.

3.4. Charakterisierung des angereicherten Enzyms

3.4.1. Elektrophoretische Eigenschaften

Analytische Disk-Elektrophoresen in Polyacrylamidgelen (2.9.) wurden grundsätzlich mit allen Proteinlösungen durchgeführt, die Methyltransferase Aktivität aufwiesen. Statt wie üblich bei Zimmertemperatur führten wir die Analysen bei 0°C durch, da bei tieferen Temperaturen wesentlich schärfere Proteinbanden und damit eine bessere Trennung erhalten werden.

In Abb. 19 sind Trennungen bei 22°C und 0°C einander gegenübergestellt. Für beide Versuche wurden die gleichen Proteinlösungen verwendet.

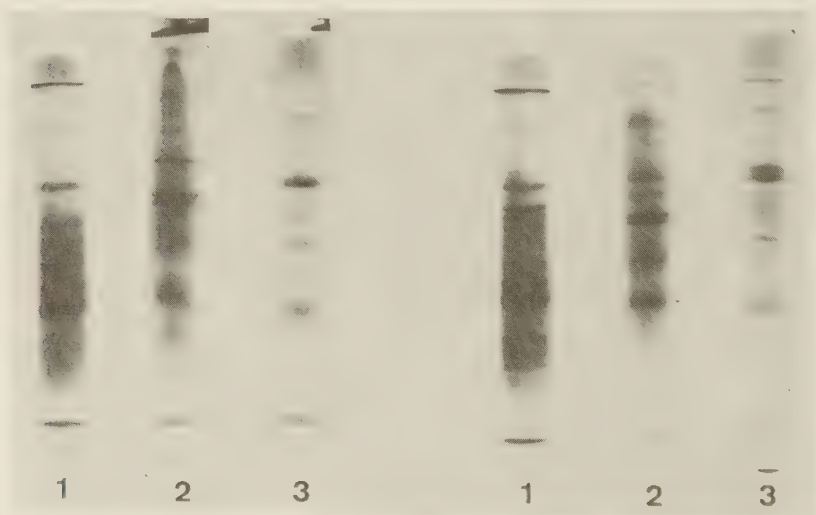


Abb. 19

Disk-Elektrophorese von drei verschiedenen Proteinlösungen; links Trennung bei 22°C , rechts Trennung bei 0°C . Bedingungen siehe 2.9.

Lokalisierung der t-RNA (Guanin-7) Methyltransferase im Polyacrylamidgel

Analytische Disk-Elektrophorese von 80 µg Protein der vereinigten Fraktionen 78-85 (Guanin-7 Methyltransferase Aktivität) in 5,6 % Polyacrylamidgelen bei 0°C zeigte nach Anfärbung mit Coomassie Brilliant Blue G 250 drei Hauptbänder.

Ein unter gleichen Bedingungen angefertigtes ungefärbtes Gel wurde in 2 mm starke Scheibchen zerschnitten und diese ohne weitere Vorbehandlung auf die Anwesenheit von Methyltransferase Aktivität getestet. Im Standard Aktivitätstest mit t-RNA_f^{Met} aus *B. subtilis* als Substrat wurde mit dieser Technik in zwei Proteinbändern Methyltransferase Aktivität gefunden.

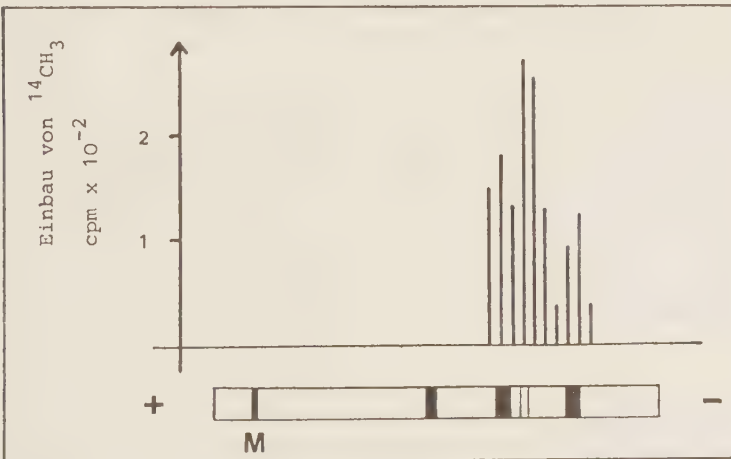


Abb. 20

Analytische Disk-Elektrophorese von 80 µg Protein der Frakt. 78-85 (Guanin-7 Methyltransferase Aktivität). Die obere Graphik gibt den Einbau von ¹⁴C-Methylgruppen pro 2 mm zerteiltes PAA-Gel im Standard Methyltransferase Test an. Darunter ein ungeschnittenes und gefärbtes analoges Gel mit Lage der Proteinbänder. Bedingungen siehe 2.9.

3.4.2. Molekulargewichtsbestimmung durch Diffusionschromatographie an Sephadex G 200

Nach Whitacker, Andrews u.a. (55) (1) ergibt sich beim Lauf von globulären Proteinen an genau äquilibrierten Sephadex Säulen eine lineare Abhängigkeit zwischen dem Logarithmus des Molekulargewichtes und dem Elutionsvolumen, bzw. dem Quotienten aus Elutions- und Ausschlußvolumen.

Nach diesem Prinzip wurden auf eine Sephadex G 200 Säule vier annähernd globuläre Proteine und Dextran Blau zur Bestimmung des Ausschlußvolumens aufgetragen und ihrer jeweiligen Elutionsvolumina gemessen.

Abb. 21 zeigt die erhaltene Abhängigkeit des Molekulargewichtes dieser Eichproteine von ihrem Elutionsvolumen.

- Abb. 21 -

Nach Auftrag von 1 ml ($\approx$ 415 μ g Protein) der Fraktion 78-85 (3.3.) ergaben sich beim Methyltransferase Test im Eluat zwei Orte mit Enzymaktivität. Sie entsprechen den Molekulargewichten 100 000 bzw. 300 000 (Dalton).

3.4.3. Bestimmung des pH Optimums

Bisher veröffentlichte Angaben über pH Optima von t-RNA Methyltransferasen aus Pro- und Eukaryonten-Extrakten lagen stets im leicht alkalischen bis neutralen Bereich (Nau 1976). Bei ihrer Ermittlung waren die eingesetzten Puffersysteme zunächst darauf überprüft worden, ob die in ihnen enthaltenen Ionenarten bzw. ihre Konzentrationen die Methylierungsreaktion hemmen.

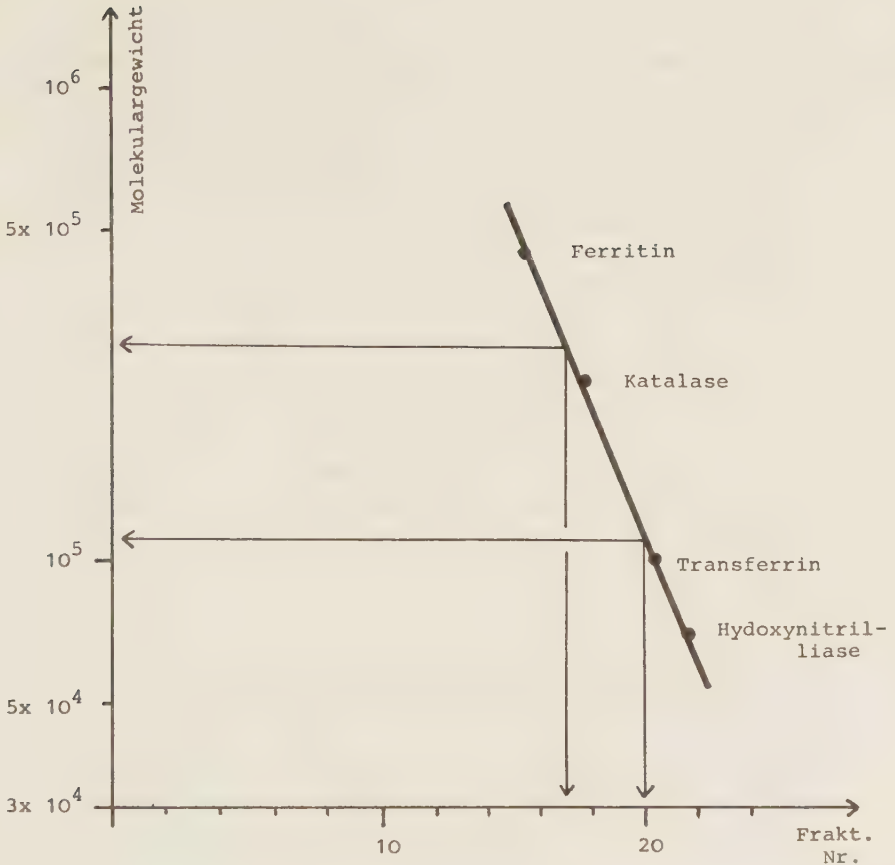


Abb. 21

Molekulargewichtsbestimmung der Guanin-7 Methyltransferase Aktivität (vereinigte Frakt. 78-85)

Säule: Sephadex G 200; $l = 40$ cm; $d = 0,5$ cm; Durchsatz = $0,84$ ml/h = Fraktionsvolumen; Elutionsmittel $0,05$ M Sörensen Phosphat pH 8,0 $0,5$ mM 2-Mercaptoöthanol; peristaltikfreie, synchron motorgetriebene Pumpe (Perpex)

Methyltransferase Test: $0,1$ OD₂₆₀ t-RNA_f^{Met} *B. subtilis*, 50 ul Eluat und $0,2$ uCi / 19 nMol SAM. Ansatzvolumen 160 ul, Entnahme 100 ul nach 120 Min.

Die Bestimmung des pH Optimums der angereicherten t-RNA (Guanin-7) Methyltransferase wurde mit einem Triäthanolamin/HCl Puffer mit 0,01 M Magnesiumchlorid nach Hurwitz et al. 1964 (20) durchgeführt; der gleiche Puffer wurde auch bisher zur Bestimmung der Methyltransferase Aktivität verwendet (2.6.).

Der Ansatz dieses Aktivitätstestes hatte folgende Zusammensetzung:

50	ul	TMMG Puffer (0,1 M Triäthanolamin/HCl, 0,02 M 2-Mercaptoäthanol, 0,01 M Magnesiumchlorid)	pH 8,0
50	ul	t-RNA Lösung in Wasser	pH 5,8
50	ul	Enzym Lösung (0,1 M Phosphat)	pH 8,0
10	ul	^{14}C -SAM (0,2 uCi / 19 nMol)	pH 3,0
20	ul	0,05 M Tris/HCl Puffer	pH 8,0
180	ul	Testansatz	pH 7,9

Triäthanolamin/HCl puffert im Bereich von pH 7,0 - 8,8 Beisenhertz et al. 1953 (12). Durch Einsatz von TMMG Puffern abgestuften pH's läßt sich der pH Wert des gesamten Testansatzes verändern (Abb. 22). Der hier wiedergegebene Zusammenhang zwischen den pH Werten des Testansatzes und des eingesetzten TMMG Puffers wurde in "Phantomproben" folgender Zusammensetzung ermittelt:

500	ul	TMMG Puffer, variabler pH Wert	.
500	ul	Aqua bidest.	pH 5,8 (entspr. t-RNA Lösg.)
500	ul	0,1 M Sörensen Phosphat Puffer	pH 8,0 (entspr. Enzym Lösung)
100	ul	0,001 n Schwefelsäure	pH 3,0 (entspr. SAM Lösung)
200	ul	0,05 M Tris/HCl Puffer	pH 8,0

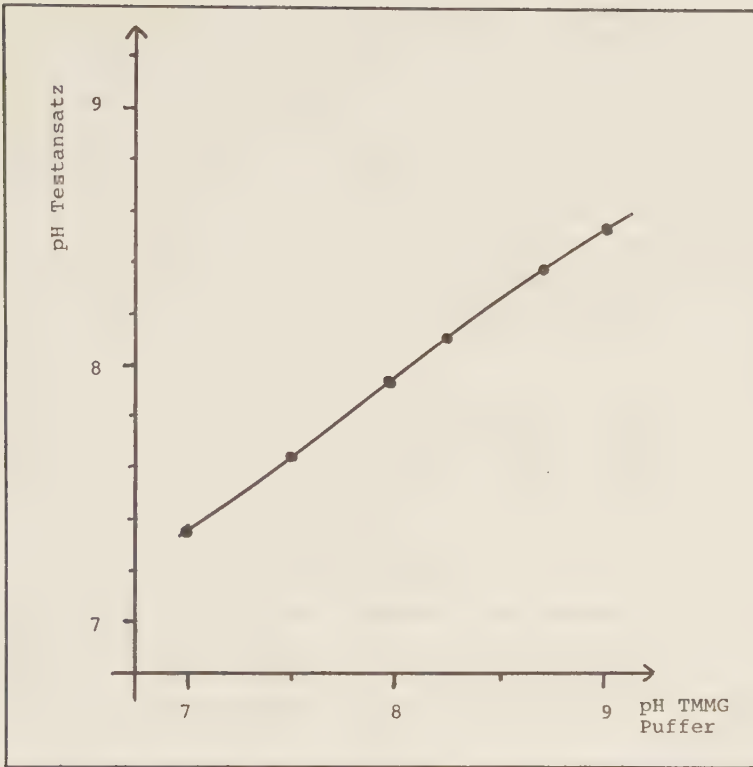


Abb. 22

Testansatz-pH Wert (Standard Methyltransferase Test) als funktion vom pH Wert des TMMG Puffers.

Es wurden nach der in Abb. 22 gezeigten Kurve nun Testansätze von verschiedenem pH hergestellt und in jeweils 50 μ l der vereinigten Fraktionen 78-85 die Guanin-7 Methyltransferase Aktivität (Anfangsgeschwindigkeit) mit t-RNA_f^{Met} (B. subtilis) als Substrat bestimmt.

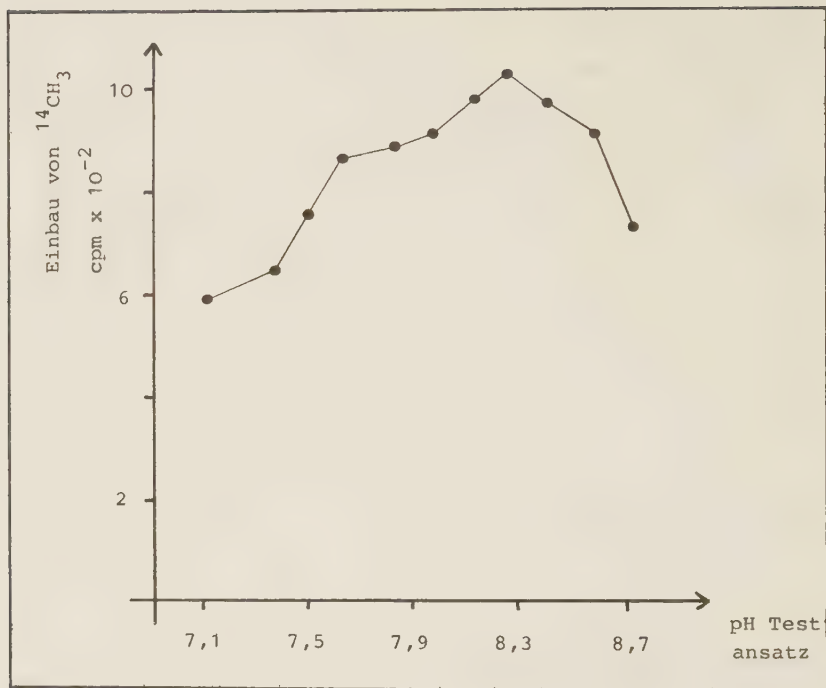


Abb. 23

Abhängigkeit der Aktivität des gereinigten Enzyms (Frakt. 78-85 aus 3.3.) vom pH Wert des Testansatzes. Der Einbau von ^{14}C -Methylgruppen wurde nach jeweils 10 Min. Inkubation bestimmt. Testbedingungen siehe 2.6.

Auf Grund der Angaben aus der Literatur wurde zunächst der pH Bereich zwischen 7,2 und 8,8 geprüft. Hier ergab sich ein Optimum von pH 8,3. Wird der engere Bereich zwischen pH 8,0 und 8,6 untersucht, so findet sich ein Optimum der Enzymaktivität der angereicherten Guanin-7 Methyltransferase bei pH 8,25.

Um sicher zu sein, daß ein etwaiges Optimum im leicht

sauren Bereich nicht übersehen würde, ist bei einem Test der Anteil von 0,05 M Tris/HCl Puffer pH 8,0 durch 0,01 n Salzsäure ersetzt worden. In der Mischung ergab sich ein pH Wert von 5,8. Unter diesen Bedingungen findet keine Methylierung der t-RNA statt.

Als Kontrolle dieser Versuche wurde der frühere Test bei pH 7,9 mitgeführt. Die Aktivitätsdifferenz zwischen der Kontrolle und dem neu ermittelten Optimum beträgt nach mehreren Messungen im Durchschnitt 10 %.

3.4.4. Bestimmung der optimalen Magnesium Konzentration

Magnesium wird bei Methylierungsreaktionen in Konzentrationen von 10^{-3} M dem Testansatz zugefügt Hurwitz et al. 1964 (20). Welchen Effekt diese Ionen auf die Methylierung ausüben ist bisher nicht genau bekannt.

In vitro läßt sich zeigen, daß Magnesium durch Polyamine wie Spermidin, Putrescin, Cadaverin u.a. ersetzt werden kann. Doch scheint auch ein Antagonismus zwischen Magnesium und Polyaminen zu bestehen Leboy et al. 1970 (28), Young et al. 1971 (54).

In vitro stimuliert Mg^{++} die Methylierung Nau 1976 (36). Polyamine stimulieren ebenfalls, jedoch nur in Abwesenheit von Magnesium.

t-RNA bindet Spuren von Magnesium sehr fest, sodaß es z.B. trotz Behandlung mit EDTA unmöglich ist, ein absolut Mg^{++} freies Substrat einzusetzen.

Deshalb wurde hier nach üblicher Präparation von t-RNA_f^{Met} B. subtilis (vgl. 2.2.2.) untersucht, welche Zusätze von Magnesium Ionen die Anfangsgeschwindigkeiten der Methylierung im Standard Aktivitätstest (2.6.) beeinflussen. Die Konzentration an zugesetztem Magnesium wurde zunächst grob variiert, später wurde dann ein engerer Bereich untersucht. Im Einzelnen betrug die Menge an zugesetztem Magnesium:

- 1.) 100 pMol, 1 nMol, 10 nMol,
 100 nMol, 1 uMol, 10 uMol,
- 2.) 100 pMol, 500 pMol, 1 nMol, 5 nMol,
 10 nMol, 100 nMol, 500 nMol, 1 uMol,

Gemessen wurde stets im ermittelten pH Optimum von 8,25.
 Zur Kontrolle wurde der früher verwendete Ansatz mit
 500 nMol Mg^{++} und pH 7,9 mitgeführt.

Zusatz von Magnesium pro Ansatz (Mol)	cpm nach 10 Min. Inkubation
100 p Mol	664
500 p Mol	674
1 n Mol	748
5 n Mol	754
10 n Mol	662
100 n Mol	700
500 n Mol	939
1 u Mol	621
10 u Mol	-

Tab. 5

Aktivitätsabhängigkeit der t-RNA (Guanin-7) Methyltransferase von der Menge an zugesetzten Magnesium Ionen im Test. Der Einbau von ^{14}C -Methylgruppen wurde jeweils nach 10 Min. bestimmt. Testbedingungen siehe 2.6.

Die Auswertung der Messungen ergibt, ähnlich wie bei der Ermittlung des pH Optimums kein scharfes Maximum. Dagegen ist der Abfall der Enzymaktivität bei hohen Magnesium Konzentrationen auffallend. Ein Zusatz von 10 $\mu\text{Mol Mg}^{++}$ hemmt die Methylierungsreaktion total.

500 nMol zugesetzter Magnesium Ionen ergeben eine optimale Aktivität der angereicherten t-RNA (Guanin-7) Methyltransferase (siehe auch 2.6.). Dieser ermittelte Wert stimmt mit den Angaben der Literatur gut überein (20) (36).

3.4.5. Bestimmung der Michaelis Konstanten

Die Michaelis Konstante (K_m) gibt die Substratkonzentration an, bei der halbmaximale Reaktionsgeschwindigkeit erreicht wird.

$$K_m = S_{1/2} V_{\max}.$$

Bei Methyltransferasen ist die exakte Bestimmung des K_m Wertes schwierig, da die Reaktion in vitro nicht ungehemmt verläuft. Einerseits wird die Methylierung durch hohe Substratkonzentrationen gehemmt, andererseits ist das bei der Reaktion entstehende S-Adenosyl-Homocystein (SAH) ein potenter Inhibitor ($K_i = 0,3 \times 10^{-6} - 2 \times 10^{-5} \text{ Mol/L}$) (Nau 1976 (36)).

Gemessen wurde der K_m Wert für t-RNA_f^{Met} (B. subtilis) mit dem Standard Test für Aktivitätsmessungen (2.6.). Die vorher ermittelten optimalen Reaktionsparameter wurden einbezogen, d.h. die Bestimmung erfolgte bei pH 8,25 und einem Zusatz von 500 nMol Mg-Ionen. Die Konzentrationen an Substrat variierten zwischen

0,5 und 0,005 OD_{260} . Proben zur Bestimmung des Einbaus von ^{14}C -Methylgruppen wurden abweichend von der bisherigen Praxis nach 2,5, 5 und 7,5 Min. entnommen, da die Anfangsgeschwindigkeiten ab 5 Min. Reaktionszeit teilweise bereits nicht mehr linear verliefen. Das Ergebnis der Versuche ist in den Abb. 24 und 25 dargestellt. In der Darstellung V / S (Abb.24) ist die Konstante graphisch nicht genau zu ermitteln. Die Hemmung der Methylierungsreaktion zeigt sich bei dieser Art der Darstellung ab einer Substratkonzentration von 0,1 OD_{260} .

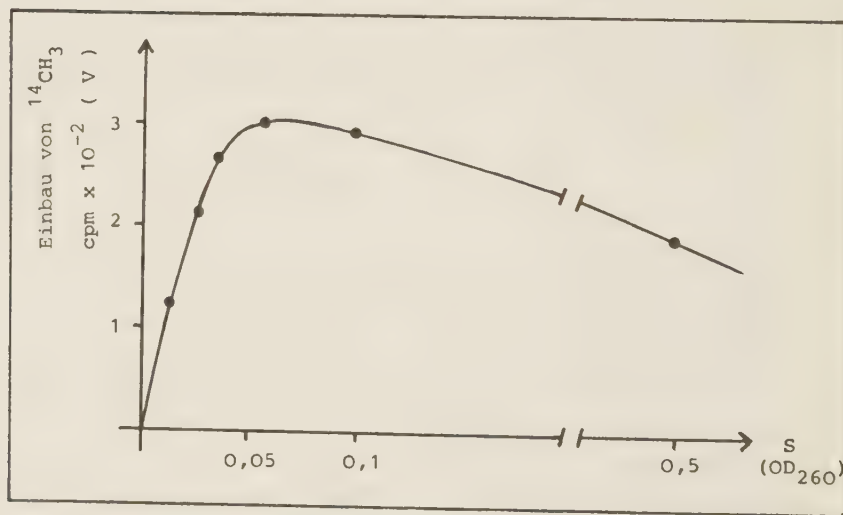


Abb. 24

Abhängigkeit der Aktivität der t-RNA (Guanin-7) Methyltransferase von der Substratkonzentration bei Methylierung von *B. subtilis* t-RNA_f^{Met}. Dargestellt ist der Einbau von ^{14}C -Methylgruppen nach 2,5 Min. Reaktionszeit. Testbedingungen siehe 2.6.

Die Michaelis Konstante der gemessenen Reaktion wurde über eine Lineweaver-Burk Darstellung ermittelt (Abb. 25). Die Hemmung der Methylierungsreaktion durch das Substrat wird bei dieser Auftragung bereits bei geringen Substratkonzentrationen sichtbar. Der K_m Wert wurde durch Anlegen der Tangente bestimmt; es ergibt sich ein Wert von:

$$K_m = 4 \times 10^{-7} \text{ Mol/L}$$

Dieser Wert stimmt mit den Angaben der Literatur gut überein. Nau 1976 ()

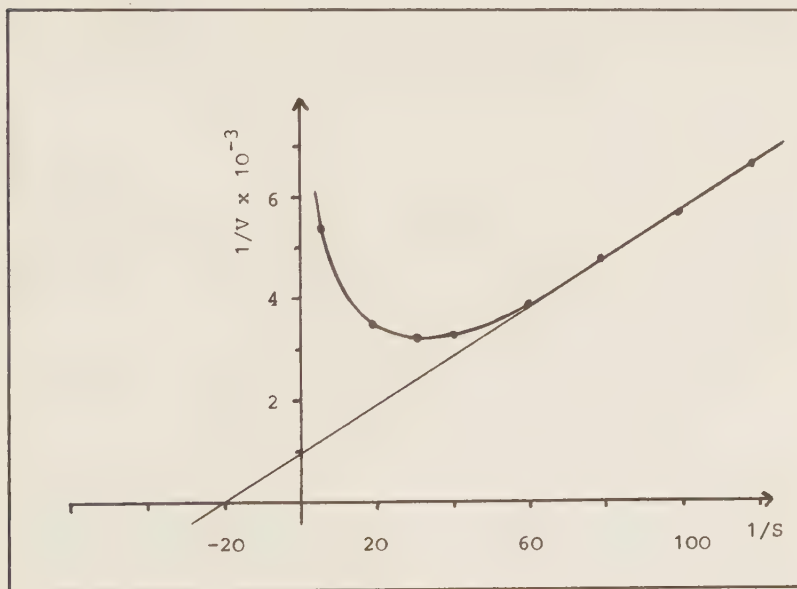


Abb. 25

Lineweaver Burk Darstellung zur Ermittlung der Michaelis Konstanten (K_m) für t-RNA_f^{Met} (B. subtilis) mit der t-RNA Guanin-7) Methyltransferase. Gezeigt ist der Einbau von ¹⁴C-Methylgruppen nach 2,5 Min. Reaktionszeit. Testbedingungen siehe 2.6.

4. Diskussion

Seit ca. 1950 weiß man um die Existenz von modifizierten Nucleosiden in Nucleinsäuren. Seither sind eine Vielzahl von Modifizierungen untersucht und aufgeklärt worden. Eine große Gruppe stellen Methylierungen dar, die in allen Nucleinsäuren vorkommen. Im Jahre 1962 wurde erstmals über Enzyme berichtet, die für die Methylierungen verantwortlich sind. Als Donator der Methylgruppe fungiert vorwiegend S-Adenosyl-Methionin, das aus ATP und Methionin gebildet wird Fleissner et al. 1962 (17). Bei einigen grampositiven Organismen hingegen wurde für die Synthese von Ribothymidin in den Arbeitskreisen Kersten und Rabinowitz ein Weg gefunden, der über ein Derivat der Tetrahydrofolsäure führt (25) (15).

Die Reinigung von t-RNA Methyltransferasen ist schwierig. Trotz vieler Anstrengungen ist es bis heute nicht gelungen ein reines Enzym zu präparieren. Die Schwierigkeiten haben mehrere Gründe:

- Die Enzyme sind sehr instabil und jeder Reinigungsschritt bedeutete einen hohen Aktivitätsverlust.
- Sie machen nur einen kleinen Teil der in der Zelle vorhandenen Proteine aus.
- Die genaue Anzahl der Enzyme ist ungeklärt und es ist auch nichts darüber bekannt, wieviele t-RNAs von einer spezifischen Methyltransferase erkannt und umgesetzt werden.
- Zur Anreicherung einer spezifischen Methyltransferase ist eine spezifische untermethylierte t-RNA notwendig. Ihre Isolierung ist sehr aufwendig.

Trotz dieser Schwierigkeiten sind einige partielle Anreicherungen in der Literatur beschrieben. Dabei wird bei verschiedenen Organismen immer gefunden, daß mindestens ein Enzym für jede spezifische Modifikation zuständig ist, manchmal aber auch mehrere Björk et al. 1969 (13), Smolar et al. 1975 (47).

Eine spezifische t-RNA Methyltransferase wurde erstmals 1973 isoliert Taya et al. 1973 (48). Für die Reinigung wurde neben klassischen Verfahren die Affinitätschromatographie eingesetzt, die in ähnlicher Form schon vorher zur Anreicherung von Aminoacyl-t-RNA Synthetasen benutzt worden war Remy et al. 1972 (41). Als Matrix verwendete man hier eine an Sepharose gekoppelte spezifische t-RNA. Es resultierte eine spezifische t-RNA Methyltransferase verunreinigt mit einigen Begleitproteinen.

Anstelle einer spezifischen t-RNA wurde nun in dieser Arbeit versucht, eine Matrix mit Gesamt t-RNA zur Methyltransferase Anreicherung einzusetzen. Für Aminoacyl-t-RNA Synthetasen ebenso wie für Methyltransferasen sind solche Reinigungen parallel zu dieser Arbeit beschrieben Jakubowski et al. 1975 (21), Wierzbika et al. 1975 (50). Im Gegensatz zu den hier geschilderten Versuchen ist es dabei allerdings nicht gelungen einzelne spezifische t-RNA Methyltransferasen voneinander zu trennen, bzw. größere Ausbeuten zu erzielen.

Der hier eingeschlagene Weg bringt im Gegensatz zu den klassischen Chromatographie - Verfahren neben einer hohen Anreicherung auch eine wesentlich höhere Ausbeute an spezifischer Methyltransferase.

Das ist darauf zurückzuführen, daß die Reinigung nicht wie sonst beschrieben mehrere Schritte erfordert, sondern daß abgesehen von der Entsalzung und Einpufferung an Sephadex G 25 nur ein einziger Chromatographieschritt notwendig ist um zu einer spezifischen Methyltransferase zu kommen.

Die während dieser Arbeit ebenfalls durchgeführten aber nicht beschriebenen Versuche zur Anreicherung von t-RNA Methyltransferasen mit anderen chromatographischen und elektrophoretischen Verfahren haben durchweg keine brauchbaren Ergebnisse erbracht. In Anlehnung an die Literatur wurde versucht diese Verfahren optimal auszulegen. Eine eventuell mögliche Optimierung für jedes dieser Verfahren durchzuführen war aber im Rahmen dieser Arbeit nicht möglich und auch nicht sinnvoll, da mit der Affinitätschromatographie die besten Resultate erzielt wurden. Daraus kann man den Schluß ziehen, daß diese Methode das zur Zeit erfolgreichste Verfahren zur Anreicherung von t-RNA Methyltransferasen ist.

Es ist möglich gereinigte Enzympräparationen durch Zusatz von normal methylierter t-RNA zu stabilisieren; es kann sogar z.B. rohe Hefe-RNA verwendet werden Aschhoff 1974 (7).

Somit ist die hohe Ausbeute an Aktivität durch die stabilisierende Wirkung der Matrix t-RNA auf die Methyltransferasen zu erklären. Während der Reinigung wird die sonst übliche Inaktivierung verhindert und die Komplexbildung zwischen Methyltransferasen und gekoppelter t-RNA für die Trennung ausgenutzt.

Durch Einfrieren der Enzymlösungen in flüssiger Luft kann eine Stabilisierung für lange Zeit erfolgen. Die sonst oft angewandte Methode - Zusatz von 50 % Glycerin und Lagerung bei -20°C - ist zwar auch möglich, führt aber zu einer schlechteren Haltbarkeit und zusätzlicher Verdünnung der Proben.

Bei der Suche nach der nicht eluierbaren t-RNA (Uracil-5) Methyltransferase, die im Ausgangsmaterial Proteinfraktion B vorhanden war, wurde t-RNA Sepharose anstelle von Enzym im Methyltransferase-Test eingesetzt. Die Tatsache, daß ein an t-RNA gebundenes Enzym mit zugesetztem Substrat

und ^{14}C -SAM noch eine Methylierung ergibt, könnte ein Hinweis darauf sein, daß die Bindungsstelle zwischen Enzym und Substrat nicht im aktiven Zentrum liegt.

Als Substrat für t-RNA Methyltransferasen wurde neben untermethylierter Gesamt t-RNA aus *E. coli* die Initiator t-RNA aus *B. subtilis* ($\text{t-RNA}_f^{\text{Met}}$) eingesetzt.

Die Initiator t-RNA aus *B. subtilis* unterscheidet sich von der Initiator t-RNA aus *E. coli* dadurch, daß ein nicht modifiziertes Guanin statt 7-Methyl-Guanin im Extraarm (Pos. 47) und ein Cytidin statt eines Ribose-methylierten Cytidin in der Anticodon Schleife (Pos. 33) vorhanden ist. Im übrigen zeigen die beiden t-RNAs

- mit kleinen Ausnahmen - Sequenz-Homologie Dube et al. 1969 (16), Yamada et al. 1975 (52).

Mit *E. coli* Rohextrakt (S-100) oder Proteinfraction B können diese beiden Methylgruppen (m^7G , C_m) in $\text{t-RNA}_f^{\text{Met}}$ aus *B. subtilis* eingeführt werden. Aus diesem Grund kann Initiator t-RNA aus *B. subtilis* als Substrat für Methyltransferasen aus *E. coli* verwendet werden.

Im Verlauf der Affinitätschromatographie werden mehrere Guanin methylierende Aktivitäten von der t-RNA Sepharose Säule eluiert. Mit niedriger Salzkonzentration (0,04 M) wird eine Guanin spezifische Methyltransferase eluiert, die *B. subtilis* $\text{t-RNA}_f^{\text{Met}}$ nicht methyliert. Mit höherer Ionenkonzentration wird eine t-RNA (Guanin-7) Methyltransferase eluiert, die diese $\text{t-RNA}_f^{\text{Met}}$ als Substrat akzeptiert. Es treten unter den beschriebenen Elutionsbedingungen zwei Proteinfractionen mit m^7G -Methyltransferase Aktivität auf.

Von den t-RNAs aus *B. subtilis* ist bekannt, daß die hier verwendete $\text{t-RNA}_f^{\text{Met}}$ kein 7-Methyl-Guanin im Extraarm besitzt. Anders hingegen die $\text{t-RNA}^{\text{Phe}}$ (*B. subtilis*); hier befindet sich an der gleichen Position eine m^7G -Modifikation. In *B. subtilis* ist eine t-RNA (Guanin-7) Methyltransferase vorhanden die zwar $\text{t-RNA}^{\text{Phe}}$, nicht jedoch $\text{t-RNA}_f^{\text{Met}}$ methyliert Arnold et al. 1973 (3).

Die Sequenzanalysen von *E. coli* t-RNAs zeigen, daß von ca. 20 bisher untersuchten t-RNAs 12 eine m^7G -Methylierung tragen Barrel et al. 1974 (9). Immer dann, wenn in einer *E. coli* t-RNA ein "kleiner" Extraarm mit 5 ungepaarten Basen auftritt und in der Mitte dieser Basen ein Guanin steht, ist dieses ein 7-Methyl-Guanin. Dies gilt nur unter der Voraussetzung, daß die bisher untersuchten *E. coli* t-RNAs einen repräsentativen Querschnitt aller t-RNAs dieses Organismus darstellen.

Der Befund, daß sich mit gereinigtem Enzym ca. 60 % aller t-RNAs in untermethylierter Gesamt t-RNA aus *E. coli* methylieren lassen kann rein zufällig sein. Es fällt jedoch auf, daß ebenfalls 60 % aller bisher sequenzierten t-RNAs aus *E. coli* die m^7G -Methylierung tragen. Diese Befunde könnten zu dem Schluß führen, daß mit dem gereinigten Enzym alle untermethylierten t-RNAs die überhaupt in dieser Position methylierbar sind auch methyliert werden. Eindeutig beantwortet werden kann diese Frage aber erst, wenn alle t-RNAs aus *E. coli* sequenziert sind.

Ob die in dieser Arbeit gefundenen Unterschiede zwischen verschiedenen Guanin methylierenden Aktivitäten auf das verwendete heterologe System - Methyltransferase aus *E. coli* und t-RNA aus *B. subtilis* - zurückzuführen sind, oder ob bei der Reinigung von Methyltransferasen Artefakte entstehen kann nicht entschieden werden. Aus der Literatur sind Fälle bekannt, wo ebenfalls mehrere t-RNA Methyltransferasen in einem Organismus vorkommen, die die gleiche Basenspezifität haben. In *Saccharomyces cerevisiae* beschreibt Björk (13) die Existenz von mindestens drei verschiedenen t-RNA (Uracil-5) Methyltransferasen. In Hefe ist der Nachweis von zwei m^1G spezifischen Methyltransferasen gelungen Smolar et al. 1975 (47).

Durch die Ergebnisse der zitierten Literatur kann aber auch nicht schlüssig bewiesen werden, daß für jede Basen- oder Zuckermethylierung d.h. für eine "Spezifität" ein einzelnes Enzym zuständig ist.

Alles in allem legen die hier gefundenen Ergebnisse die Vermutung nahe, daß Methyltransferasen bei ihrer Reinigung in ihrem strukturellen Aufbau und damit in ihrem spezifischen Erkennungsvermögen verändert werden.

Der Mechanismus der Erkennung zwischen Methyltransferase und t-RNA ist heute noch ungeklärt. Man stellt sich vor, daß die Enzyme eine bestimmte Sequenz oder Tertiärstruktur oder beides zusammen erkennen Baguley et al. 1970 (8), Kuchino et al. 1970 (27), Shershneva et al. 1973 (46). Da die Sequenzen der bisher bekannten t-RNAs aber stark differieren - auch die Umgebung der zu methylierenden Position - ist eine Existenz mehrerer Basen- und Sequenz-spezifischer Methyltransferasen auch nicht auszuschließen. Daneben scheint die Spezifität der Methylierung durch Zusatz von Polyaminen beeinflussbar zu sein Wildenauer et al. 1974 (51).

Die Spezifität des hier beschriebenen angereicherten Enzyms ist eindeutig, solange für die Hydrolyse der methylierten t-RNA drastische Bedingungen eingesetzt werden. Die saure Hydrolyse mit Perchlorsäure ergibt eindeutig ein Produkt. Bei der enzymatischen Hydrolyse dagegen taucht ein zusätzlicher unbekannter Fleck auf. Dieser unbekannte Fleck konnte wiederum durch drastische Bedingungen (Ameisensäure) in das vermutete Produkt umgesetzt werden. Im Arbeitskreis Söll konnte gezeigt werden, daß bei der enzymatischen Hydrolyse von methylierter t-RNA mit Ribonuclease T_2 die Modifikation m^7G ein Hindernis darstellt Marinus et al. 1975 (32). Selbst durch Nachverdauung des unbekannten Fleckes mit Ribonuclease T_2 konnte keine vollständige Umsetzung zu m^7G_p erreicht werden (Björk pers. Mitt.).

Damit war eindeutig bewiesen, daß es sich bei dem angereicherten Enzym um eine einzelne Spezifität handelt.

Die Polyacrylamid Gelelektrophorese ergibt für die gereinigten Fraktionen noch drei Banden, d.h. im Eluat sind unter den beschriebenen Bedingungen noch drei verschiedene Proteine nachweisbar. Die Suche nach der enzymatisch aktiven Bande zeigt Aktivität in zweien der drei Banden.

Ein ähnliches Ergebnis, wenn auch unter anderen Bedingungen erhalten, bringt die Bestimmung des Molekulargewichtes. Auch hier spaltet sich die vorher homogen scheinende Aktivität in zwei Proteine auf, die den Molekulargewichten 100 000 und 300 000 Dalton entsprechen.

Ob hier ein proteolytischer Abbau während der Reinigung stattfindet, ob das Enzym in Untereinheiten zerfällt, oder ob es sich doch um zwei Enzyme handelt, kann aus den Ergebnissen dieser Arbeit nicht entschieden werden. Eine Beantwortung dieser Frage kann erst erfolgen, wenn es gelingt die beiden aktiven Komponenten in einer aktiven Form zu isolieren.

Die bei der Charakterisierung weiterhin gefundenen Werte stimmen, soweit überhaupt vergleichbare Daten vorliegen, gut mit den Werten anderer Autoren überein.

Für t-RNA Methyltransferasen sind in der Literatur pH-Optima beschrieben, die im Bereich von pH 7 - 9 liegen Nau 1976 (36). Der gefundene Wert von pH 8,25 liegt in dem für bakterielle Systeme beschriebenen Bereich.

Obwohl die Rolle von Magnesium Ionen bei der Methylierungsreaktion ungeklärt ist, ist dennoch bekannt, daß durch den Zusatz im in vitro Test die Aktivität der Methyltransferasen erhöht werden kann. Das setzt voraus, daß keine Polyamine zugesetzt oder vorhanden sind, da sie ebenso wie manche einwertige Ionen einen antagonistischen Effekt haben Leboy et al. 1970 (28), Young et al. 1971 (54). Die bisher verwendete und in der Untersuchung als optimal bestätigte Menge von 500 nMol Zusatz stimmt in der Größenordnung mit den Angaben der Literatur überein.

Die Bestimmung der Michaelis Konstanten ist für t-RNAs und Methyltransferasen des öfteren durchgeführt worden. Dabei wurde, abgesehen von einer Ausnahme, durchweg weder spezifisches Substrat noch hochreine Enzyme verwendet. Für Rohextrakte und Gesamt t-RNA wurden Werte zwischen 3×10^{-6} und 2×10^{-5} Mol/L gefunden. Für spezifische t-RNA und gereinigtes Enzym sollten die Werte tiefer liegen. Der hier gefundene Wert von 4×10^{-7} Mol/L stimmt mit dem einzig vergleichbaren Wert aus der Literatur - $7,8 \times 10^{-7}$ Mol/L ; Kraus et al. 1974 (26) - gut überein.

5. Zusammenfassung

Bakterienrohextrakt aus *E. coli* enthält t-RNA Methyltransferasen, die in untermethylierter Gesamt t-RNA aus Methionin-auxotrophen *E. coli* K 12 hauptsächlich Uracil zu 5-Methyl-Uracil, Guanin zu 7-Methyl-Guanin und Cytidin zu 2'-O-Methyl-Cytidin methylieren. Im Rahmen dieser Arbeit ist es gelungen, eine t-RNA Methyltransferase durch Affinitätschromatographie über 1000-fach anzureichern, die Guanin in N-7 Stellung methyliert. Als Matrix diente eine Sepharose, die normale Gesamt t-RNA aus *E. coli* in kovalenter Bindung enthielt.

Außer untermethylierter Gesamt t-RNA aus *E. coli* methyliert dieses Enzym in t-RNA_f^{Met} aus *B. subtilis* nur Guanin zu 7-Methyl-Guanin. Es gelingt auf diese Weise 0,85 Methylgruppen pro t-RNA Molekül einzuführen. Die in *E. coli* ebenfalls vorhandene t-RNA (Uracil-5) Methyltransferase wird unter den beschriebenen Bedingungen so fest an t-RNA Sepharose gebunden, daß sie in aktiver Form nicht eluiert werden kann.

Die elektrophoretische Untersuchung des angereicherten Enzyms in Polyacrylamid Gelen ergibt drei Hauptbanden. In zwei Banden ist enzymatische Aktivität nachweisbar.

In der Diffusionschromatographie trennt sich das angereicherte Enzym ebenfalls in zwei Aktivitäten auf, die den Molekulargewichten 100 000 bzw. 300 000 entsprechen.

Bei der weiteren Charakterisierung der Guanin-7 Methyltransferase Aktivität wird das pH Optimum bei pH 8,25 und der optimale Zusatz an Magnesium Ionen bei 500 nMol gefunden. Die Michaelis Konstante für t-RNA_f^{Met} aus *B. subtilis* liegt bei 4×10^{-7} Mol/L.

Diese Größen stimmen mit den für bakterielle Systeme ermittelten Werten der Literatur überein.

6. Literaturverzeichnis

- 1) Andrews, P., (1965)
Biochem. J. 96 595 - 606
- 2) Arnold, H.H., (1973)
Dissertation Universität Erlangen-Nürnberg
- 3) Arnold, H.H., Kersten, H., (1973)
FEBS Lett. 36 34 - 38
- 4) Arnold, H.H., Kersten, H., (1975)
FEBS Lett. 53 258 - 261
- 5) Aronson, J.N., Borris, D.P. (1967)
Anal. Biochem. 18 27 - 31
- 6) Aschhoff, H.J., Arnold, H.H., Kersten, W., Kersten H.,
(1972) Hoppe Seylers Z. 353 1501 - 1502
- 7) Aschhoff, H.J., (1974)
IX. FEBS Meeting Budapest
- 8) Baguley, B.C., Wehrli, W., and Staehelin, M., (1970)
Biochemistry 9 1645 - 1649
- 9) Barrel, B.G., Clark, B.F.C. (1974) in Handbook of
Nucleic Acids Sequences (Joynson-Bruwers Ltd. ,
Eynsham, Oxford), 1 ed
- 10) Bartkowiak, S., Pawelkiewicz, J., (1972)
Biochim. Biophys. Acta 272 137 - 140
- 11) Befort, J.J., Befort, N., Petrissant, G., Remy, P.,
Ebel, J.P., (1974) Biochimie 56 625 - 631
- 12) Beisenhertz, J. (1953)
Z. Naturforsch. 86 555 - 561
- 13) Björk, G.R., Svensson, I., (1969)
Europ. J. Biochem. 9 207 - 215

- 14) Both, G.W., Banerjee, A.K., Shatkin, A.J., (1975)
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 72 1189 - 1193

- 15) Delk, A.S., Rabinowitz, J.C., (1975)
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 72 528 - 530

- 16) Dube, S.K., Marker, K.A., (1969)
Europ. J. Biochem. 8 256 - 262

- 17) Fleissner, E., Borek, E., (1962)
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 48 1199 - 1203

- 18) Glick, J.M., Ross, S., Leboy, P.S., (1975)
Nucleic Acids Res. 2 1639 - 1651

- 19) Hayashi, H., (1973)
J. Biochem. 74 203 - 208

- 20) Hurwitz, J., Gold, M., Anders, M., (1964)
J. Biol. Chem. 239 3462 - 3473

- 21) Jakubowski, H., Pawelkiewicz, J., (1975)
Biochim. Biophys. Acta 407 213 - 221

- 22) Kahle, P., Hoppe-Seyler, P., Kröger, H., (1971)
Biochim. Biophys. Acta 240 384 - 391

- 23) Kerr, S.J., Borek, E., (1972)
Advan. of Enzymol. 36 1 - 27 (Interscience
Publishers New York)

- 24) Kersten, W., Kersten, H., (1974)
in: Proc. IX. FEBS Meeting 34 99
Verlag Ungar. Akad. d. Wiss. Budapest

- 25) Kersten, H., Sandig, L., Arnold, H.H., (1975)
FEBS Lett. 55 57 - 60

- 26) Kraus, J., Staehelin, M., (1974)
Nucleic Acids Res. 1 1455 - 1478

- 27) Kuchino, Y., Nishimura, S., (1970)
Biochem. Biophys. Res. Comm. 40 306 - 313
- 28) Leboy, P.S., (1970)
Biochemistry 9 1577 - 1584
- 29) Littauer, U.Z., Inouye, H., (1973)
Ann. Rev. Biochem. 42 439 - 470
- 30) Lowry, O.H., Rosenbrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J.,
(1951) J. Biol. Chem. 193 265 - 275
- 31) Mans, R.L., Novelli, G.D., (1961)
Arch. Biochem. Biophys. 94 48 - 53
- 32) Marinus, M.G., Morris, N.R., Söll, D., Kwong, T.C., (1975)
J. Bacteriol. 122 257 - 265
- 33) Maurer, H.R., (1971) in:
Disc Electrophoresis, W.de Gruyter, Berlin - New York 2 ed
- 34) Mittbach, J., (1973)
Diplomarbeit Universität Erlangen-Nürnberg
- 35) Murphy, J.B., Kies, M.W., (1960)
Biochim. Biophys. Acta 45 382 - 384
- 36) Nau, F., (1976)
Biochimie 58 629 - 645
- 37) Nishimura, S., (1972)
Progr. Nucleic Acid Res. Mol. Biol. 12 49 - 85
(Davidson, J.N. & Cohn, W.E., eds.), Acad. Press New York
- 38) Peacock, A.C., Dingman, C.W. (1967)
Biochemistry 6 1818
- 39) Raettig, R., (1976)
Dissertation Universität Erlangen-Nürnberg
- 40) Raettig, R., Schmidt, W., Mahal, G., Kersten, H.,
Arnold, H.H. (1976)
Biochim. Biophys. Acta 435 109 - 118

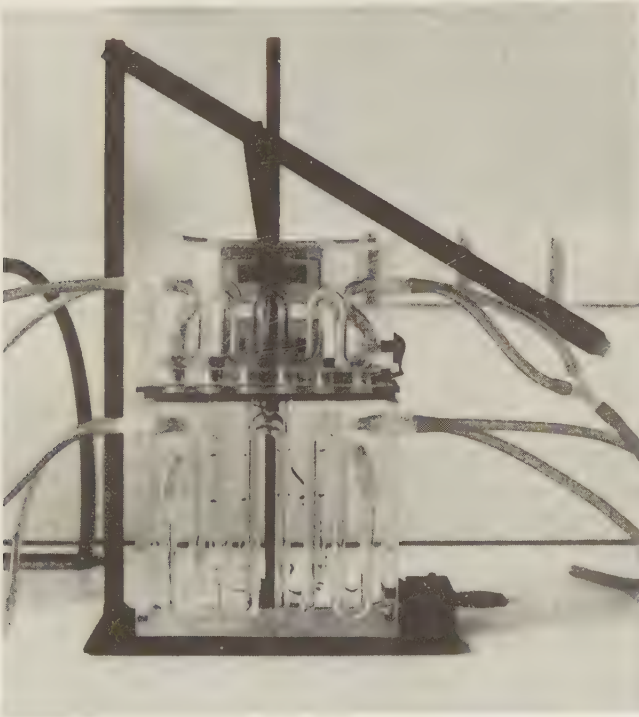
- 41) Remy, P., Birmele, C., Ebel, J.P., (1972)
FEBS Lett. 27 134 - 138
- 42) Richards, E.G., Coll, J.A., Gratzner, W.B., (1965)
Anal. Biochem. 12 452 - 471
- 43) Richter, D., Erdmann, V.A., Sprinzl, M., (1973)
Nature New Biology 246 132 - 135
- 44) Schäfer, K.P., Söll, D., (1974)
Biochimie 56 795 - 804
- 45) Schmidt, W., Arnold, H.H., Kersten, H., (1975)
Nucleic Acids Res. 2 1043 - 1051
- 46) Shershneva, L.P., Venkstern, T.V., Bayev, A.A. (1973)
FEBS Lett. 29 132 - 134
- 47) Smolar, N., Hellman, U., Svensson, I., (1975)
Nucleic Acids Res. 2 993 - 1004
- 48) Taya, Y., Nishimura, S., (1973)
Biochem. Biophys. Res. Comm. 51 1062 - 1068
- 49) Udenfriend, M., (1969)
Anal. Biochem. 30 391 - 394
- 50) Wierzbicka, H., Jakubowski, H., Pawelkiewicz, J., (1975)
Nucleic Acids Res. 2 101 - 111
- 51) Wildenauer, D., Gross, H.J., Riesner, D., (1974)
Nucleic Acids Res. 1 1165 - 1182
- 52) Yamada, Y., Ishikura, H., (1975)
FEBS Lett. 54 155 - 158
- 53) Yang, W.K., Novelli, G.D., (1968)
Biochem. Biophys. Res. Comm. 31 534 - 539
- 54) Young, D.V., Srinivasan, P.R., (1971)
Biochim. Biophys. Acta 238 447 - 463

7. Anhang

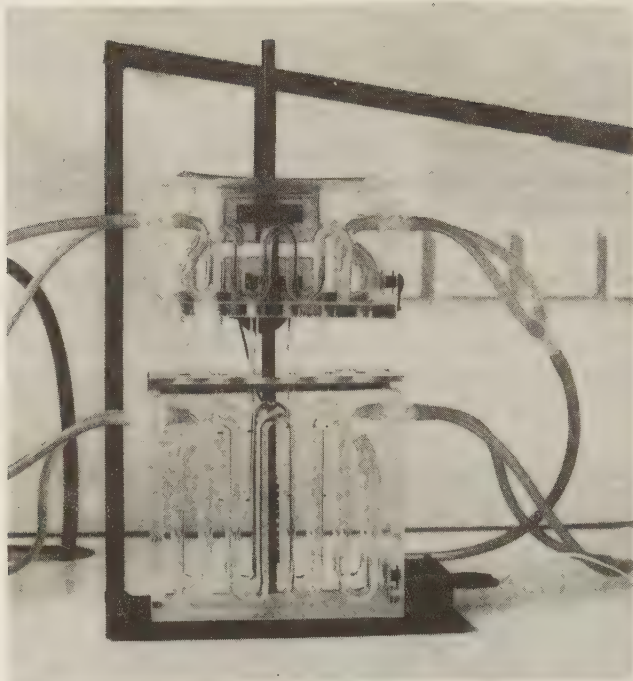
Elektrophorese Apparatur

Die in den nachfolgenden Bildern und Zeichnungen vorgestellte Apparatur bietet die Möglichkeit die analytische Polyacrylamid Gelelektrophorese bei definierten Temperaturen durchzuführen.

Dazu muß es einerseits möglich sein den Elektrophorese-puffer genau zu temperieren, andererseits sollte es aber auch möglich sein die Trennung kurzzeitig, problem- und gefahrlos zu unterbrechen, wenn verschiedene Proben gleichzeitig untersucht werden.

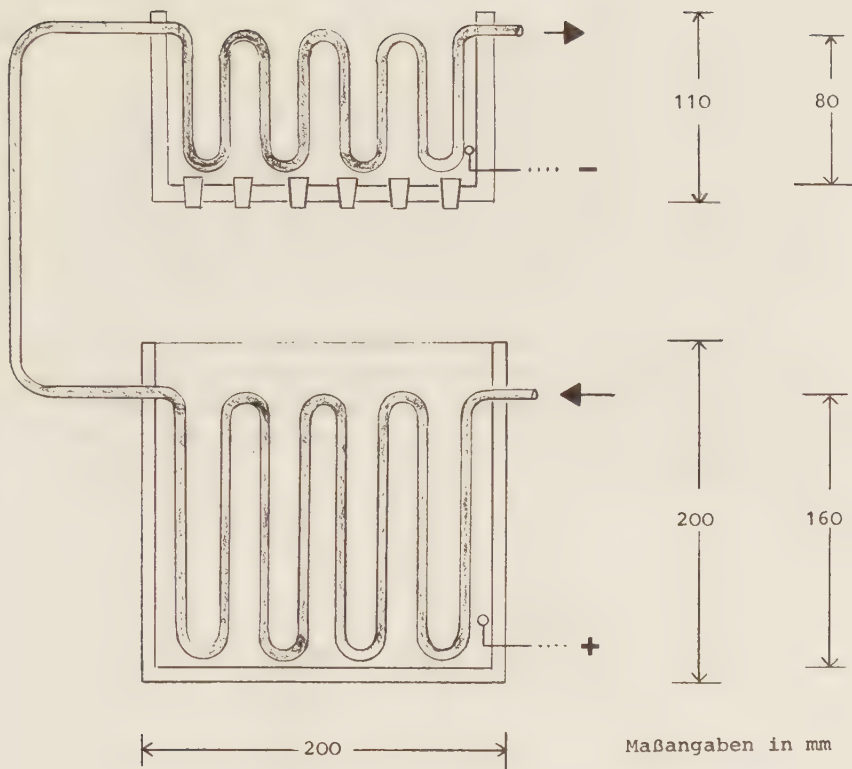


Vorderansicht in geschlossenem Zustand



Vorderansicht halb geöffnet; in dieser Stellung können Gelröhrchen entnommen werden ohne den Stromfluß zu unterbrechen.

Durch die Verwendung von zwei Kühl-(Heiz) Schlangen pro Puffergefäß wird eine genaue Einhaltung der gewünschten Temperatur erreicht. Die Kühlschlangen haben einen Abstand von ca. 3 cm, dazwischen hängen die Gelröhrchen. Der Puffer im Anodenbehälter wird zur Temperierung verwendet. Konstante Temperatur wurde durch Verwendung von Thermostaten erreicht; für die Elektrophorese bei 0°C benutzten wir die Umlaufkühlung einer Colora Kühltruhe. Dabei ist es zweckmäßig einen zusätzlichen Durchflußkühler in den



Schematische Zeichnung der Elektrophorese Apparatur in Aufsicht. Die Behälter für Anoden- und Kathodenpuffer wurden aus 10 mm Plexiglas gefertigt. Die Teile wurden mit einem Polymerisationskleber (Acrifix 92) zusammengefügt. Die Kühlschlangen bestehen aus Glasrohr ($\varnothing = 10 \text{ mm}$) mit einer lichten Weite von 8 mm. Die Durchführung durch die Seitenwände erfolgt mittels Schlauchverbinder aus Polyäthylen. Die Elektroden bestehen aus Platin - draht von 0,5 mm Stärke.

Rückfluß (!) zu schalten.

Der obere Pufferbehälter (Kathodenraum) kann über einen Hebelarm angehoben werden ohne den Stromfluß zu unterbrechen. An der Rückseite befindet sich eine Schraube, durch die der Behälter in jeder gewünschten Höhe arretiert werden kann. Die Hebekonstruktion wird immer dann gebraucht, wenn verschiedene Proben gleichzeitig untersucht werden und verschiedene Wanderungsgeschwindigkeiten haben.

Die Fixierung der für die Elektrophorese verwendeten Glasrohre am Boden des Kathodenraumes erfolgte mit durchbohrten Gummistopfen. Zur Stromversorgung wurden handelsübliche Gleichrichter z.B. von Camag oder Colora verwendet.

Frau Prof. Dr. H. Kersten danke ich herzlich für die Überlassung des Themas, die Betreuung der Arbeit und ihre ständige Diskussionsbereitschaft.

Herrn Prof. Dr. W. Kersten danke ich für die Arbeitsmöglichkeit in seinem Institut und die Förderung bei der Durchführung dieser Arbeit.

Besonderen Dank schulde ich Herrn Dr. H.J. Aschhoff, der durch die Einarbeitung in die Methoden und viele anregende Diskussionen wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat.

Frau Lydia Müller-Ali und Frau Varpu Dewes danke ich für die wertvolle technische Unterstützung.

Für hilfreiche Diskussionen und zahlreiche Anregungen danke ich allen Mitarbeitern des Instituts.

Lebenslauf

Ich wurde am 16. Februar 1945 in Hess.-Oldendorf/Weser geboren, als Sohn des Apothekers Paul Elten und seiner Ehefrau Ingeborg geb. Krohn. Ich habe noch zwei ältere Schwestern.

Von 1951 bis 1955 besuchte ich die Volksschule in Hess.-Oldendorf und trat dann in das Schillerqymnasium in Hameln ein. An dieser Schule legte ich 1966 die Reifeprüfung ab.

Nach Ableistung des Wehrdienstes begann ich 1967 das pharmazeutische Apothekerpraktikum in der St. Georgs Apotheke in St. Georgen im Schwarzwald. Das Praktikum endete 1969 mit dem erfolgreichen Bestehen der pharmazeutischen Vorprüfung in Freiburg im Breisgau.

Zur Überbrückung der Wartezeit auf einen Studienplatz begann ich im Sommersemester 1969 mit dem Studium der Betriebswirtschaft in Kiel, erhielt jedoch bereits zum Wintersemester 1969/70 einen Laborplatz in Erlangen. Das Studium der Pharmazie endete am 11. Mai 1974 mit dem pharmazeutischen Staatsexamen.

Am 14. April 1972 heiratete ich Fräulein Gerhild Lämmel, Apothekenhelferin aus Konstanz. Am 30.12. 1975 kam unsere Tochter Petra, am 16.2. 1977 unsere Tochter Katrin zur Welt.

Die vorliegende Arbeit wurde unter Leitung von Frau Prof. Dr. H. Kersten seit Juli 1974 am Institut für Physiologische Chemie der Universität Erlangen-Nürnberg erstellt.

Offsetdruck-Fotodruck

J. Hög, 8520 Erlangen, Hauptstr. 109 (Nähe Martin-Luther-Platz) Tel. 22990